



LIPROVE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



HIDROLASAS DE LÁTEX DE ESPECIES DEL GÉNERO *ARAUJA*. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS



Walter David Obregón

Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas

Dra. Nora Silvia Priolo

Directora

Año 2008

El presente Trabajo de Tesis ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Nora Silvia Priolo en el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIProVe) para optar al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas. En su transcurso se ha recibido el apoyo de una Beca de Nivel Inicial de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica y de una Beca Tipo I del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Durante el desarrollo del trabajo se realizaron estadías en el Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona, España, bajo el auspicio del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología (CYTED) y de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).

Índice general

Hipótesis de trabajo y objetivos	1
Introducción	
1. Introducción al mundo de las proteasas	3
1.2. Características de la acción enzimática	3
1.3. Clasificación de las enzimas	4
1.4. Hidrolasas vegetales	7
1.4.1. Enzimas proteolíticas	9
1.4.1.1. Clasificación y nomenclatura de las enzimas proteolíticas	11
1.4.1.2. Mecanismos catalíticos de las endopeptidasas	15
1.4.1.2.1. Peptidasas serínicas y treonínicas	15
1.4.1.2.2. Peptidasas cisteínicas	16
1.4.1.2.3. Peptidasas aspárticas	19
1.4.1.2.4. Metalopeptidasas	20
1.4.1.2.6. Peptidasas glutámicas	21
1.4.1.2.7. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido	21
1.5. Proteasas de látex	22
1.5.1. Proteasas de látex de <i>Asclepiadaceae</i>	22
2. Introducción al mundo de las “ómicas”	27
2.1. Biología molecular	30
2.1.1. Hitos en el desarrollo de la biología molecular	30
2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa	33
2.1.3. Clonación de proteasas cisteínicas vegetales	34
2.2. Proteómica	35
2.2.1. Metodología proteómica	36
3. Introducción a la biocatálisis en medios no convencionales	38
3.1. Inmovilización enzimática en distintos soportes	40
3.2. Aplicación de proteasas a la biosíntesis en medios no convencionales	43
Referencias	47

Materiales & Métodos

Purificación y caracterización de proteasas

1. Material vegetal	60
1.1. <i>Araujia angustifolia</i> (Hook. et Arn.) Decaisne	60
1.2. <i>Araujia hortorum</i> Fourn.	61
2. Aislamiento y caracterización de los extractos crudos	62
2.1. Obtención de las preparaciones enzimáticas	62
2.2. Determinación del contenido de proteínas	62
2.2.1. Método de Bradford	62
2.2.1.1. Ensayo estándar	63
2.2.1.2. Microensayo	63
2.2.2. Medida de la absorbancia directa a 280 nm	63
2.2.3. Método de biuret	63
2.3. Ensayos de actividad hidrolítica	64
2.3.1. Actividad esterolítica	64
2.3.2. Actividad amidásica	65
2.3.3. Actividad pectinmetilesterasa	65
2.3.4. Actividad carboximetilcelulasa, poligalacturonidas y xilanasas	66
2.3.5. Actividad ramnogalacturonidasa	66
2.3.6. Actividad peptidásica	66
2.3.7. Actividad carboxipeptidásica	68
2.3.7.1. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A	68
2.4. Caracterización proteolítica de los extractos crudos	69
2.4.1. Perfil de pH de la actividad proteolítica	69
2.4.2. Efecto de inhibidores	69
2.4.3. Efecto térmico o calor de inactivación	70
2.4.4. Estabilidad térmica	70
2.5. Análisis electroforético	71
2.5.1. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	71
2.5.1.1. Tipos de SDS-PAGE utilizados	71
2.5.1.1.1. Electroforesis con Tris-glicina	71

2.5.1.1.2. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina	74
2.5.1.1.3. Electroforesis en gradiente de poliacrilamida	76
2.5.1.2. Fijación y tinción	77
2.5.1.2.1. Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250	77
2.5.1.2.2. Tinción con Coomassie coloidal	78
2.5.1.2.3. Tinción con plata	79
2.5.1.3. Análisis de los geles por densitografía	81
2.5.2 . Isoelectroenfoque	81
2.5.2.1. Detección de actividad caseinolítica en geles: zimograma	85
3. Purificación de los extractos crudos	86
3.1. Cromatografía de intercambio iónico	86
3.2. Caracterización de las fracciones purificadas	87
3.2.1. Determinación del contenido de proteínas	87
3.2.2. Actividad peptidásica	87
3.2.2.1. Perfil de ph de la actividad proteolítica	88
3.2.2.2. Efecto de inhibidores	88
3.2.3. Actividad esterolítica	88
3.2.4. Actividad amidásica	88
3.2.5. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina y electroforesis en gradiente de poliacrilamida	88
3.2.8. Determinación de parámetros cinéticos	88
Metodología de las Ómicas	
1. Análisis por espectrometría de masas de las proteasas aisladas	90
2. Secuencia aminoacídica N-terminal y de péptidos internos	92
3. Mapa peptídico por espectrometría de masas (MALDI-TOF)	93
3.1. Digestión trípica en geles de poliacrilamida	93
4. Clonado de proteasas	95
4.1. Diseño de cebadores (primers) específicos	95
4.2. Aislamiento del cDNA	96
4.2.1. Extracción del RNA total	96
4.2.2. RACE-PCR	97
4.2.2.1. Reacción de retrotranscripción (RT)	97

4.2.2.2. Reacción de PCR	98
4.3. Electroforesis en geles de agarosa	99
4.4. NESTED PCR	100
4.5. Purificación de fragmentos de DNA	101
4.6. Clonado del cDNA	101
4.6.1. Medios de cultivo utilizados	101
4.6.1.1. Medios de cultivo líquidos	101
4.6.1.2. Medios de cultivo sólidos	102
4.6.1.3. reactivos adicionales	102
4.6.3.2. Obtención de células <i>e. Coli</i> competentes	103
4.7. Clonación	104
4.7.1. Ligación	105
4.7.2. Transformación y selección de los clones	105
4.7.3. Glicerinado de los clones	106
4.8. Secuenciación del cDNA clonado	107
4.8.1. Aislamiento de DNA plasmídico	107
4.8.2. Digestión con enzimas de restricción	107
4.8.3. Secuenciación del DNA	108
4.8.4. Análisis de las secuencias de los cDNAs	108
5. Modelado por homología. Bioinformática	108
Capacidad de los EC para la síntesis peptídica	
1. Inmovilización del extracto crudo	109
1.1. Entrampamiento en geles de poliacrilamida	110
1.1.1. Actividad caseinolítica de las proteasas entrampadas	110
1.2. Adsorción sobre poliamida	111
1.2.1. Evaluación de la actividad de las enzimas inmovilizadas sobre diferentes sustratos. Actividad enzimática remanente	111
1.3. Inmovilización sobre gel de agarosa	112
2. Reacción de síntesis con extractos crudos libres e inmovilizados como catalizadores	113
2.1. Selección de los medios de reacción para las síntesis	113
2.2. Selección de los sustratos para las síntesis	113

2.3. Selección del pH y temperatura para las síntesis	114
2.4. Reacciones de síntesis	114
2.5. Control analítico de los componentes de las reacciones de síntesis	114
2.6. Proceso de inmovilización	115
2.6.1. Determinación de la actividad enzimática	115
2.6.1. Determinación de proteínas	115
2.6.1. Carga enzimática y rendimiento de inmovilización	115
2.6.1. Rendimiento de proteína	116
2.6.1. Inmovilización de ec de <i>araujia hortorum</i> en gel de azarosa	116
2.7. Síntesis en medios orgánicos utilizando	
EC de <i>Araujia hortorum</i> libre como catalizador	116
Referencias	119

Resultados & Discusión

Extractos Crudos	122
Purificación del extracto crudo obtenido a partir del látex de <i>Araujia angustifolia</i>	129
Purificación del extracto crudo obtenido a partir del látex de <i>Araujia hortorum</i>	141
Clonado y secuenciamiento de araujaína aII	153
Inmovilización Enzimática & Síntesis Peptídico	168
Referencias	177

Conclusiones	179
--------------	-----



INTRODUCCIÓN

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Muchas plantas contienen látex, que es exudado cuando las mismas son dañadas, habiéndose detectado un considerable número de proteínas presentes en esta secreción. Sin embargo el rol de estas proteínas, entre las cuales hay varias enzimas, es aún motivo de especulación entre los fisiólogos vegetales. En un buen número de casos el látex contiene proteasas, a veces en cantidades tan elevadas que han dado lugar a su aprovechamiento biotecnológico (papaína, ficina).

En un trabajo reciente (Konno *et al.*, 2004) ¹ parece haber quedado demostrado que algunas proteasas juegan un importante papel en la defensa de la planta frente al ataque de insectos fitófagos. De todos modos este hecho no parece estar generalizado, ya que el látex de muchas plantas parece no contener proteasas, o al menos no contenerlas en su forma biológica activa, si se atiende a la información bibliográfica existente. Por otra parte la presencia de tejidos laticíferos tampoco es una constante en las plantas, sino que por el contrario está limitada a algunos grupos taxonómicos, siendo característica su presencia en las familias *Caricaceae*, *Moraceae*, *Euphorbiaceae*, *Apocynaceae* y *Asclepiadaceae*, entre otras.

En base a esta información y a la experiencia existente en el LIProVe en el aislamiento de fitoproteasas presentes en laticíferos, se decidió analizar el contenido de este tipo de enzimas en dos especies que crecen en la zona: *Araujia angustifolia* (Hook et Arn.) Decaisne y *A. hortorum* Fourn. (*Asclepiadaceae*).

¹ Konno, K., Ch. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori & K. Kohno (2004) "Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex". *Plant J.*, **37**: 370-8.

OBJETIVOS

- Analizar la presencia de hidrolasas en el látex obtenido mediante incisiones superficiales en frutos de *Araujia angustifolia* (Hook et Arn.) Decaisne y *A. hortorum* Fourn. (*Asclepiadaceae*), en especial endopeptidasas.
- Obtener preparaciones parcialmente purificadas de proteasas a partir del látex de ambas especies y establecer sus principales características bioquímicas, ante la posibilidad de su aplicación en eventuales procesos biotecnológicos.
- Purificar los extractos parcialmente purificados mediante técnicas cromatográficas y caracterizar sus componentes con el objeto de determinar las condiciones óptimas de actividad enzimática.
- Analizar el comportamiento de las enzimas purificadas frente a inhibidores y activadores específicos, a efectos de determinar su mecanismo catalítico.
- Establecer las preferencias de los extractos parcialmente purificados y de las enzimas puras frente a sustratos sintéticos.
- Inmovilizar las fitoproteasas en distintos soportes para evaluar la factibilidad de su empleo en procesos biotecnológicos.
- Estudiar la capacidad de las enzimas en reacciones de síntesis en medios orgánicos utilizando sistemas no convencionales.
- Aplicación de las fitoproteasas como biocatalizadores en la síntesis de pequeños péptidos de interés para la industria química, farmacéutica y de los alimentos.
- Determinar las secuencias N-terminales de las endopeptidasas purificadas.
- Intentar la clonación y secuenciamiento de alguna(s) de las endopeptidasas presentes.

1. INTRODUCCIÓN AL MUNDO DE LAS PROTEASAS

1.1. Concepto de Enzima

Químicamente las enzimas son proteínas que actúan como potentes y eficaces catalizadores. Un catalizador es una sustancia que acelera una reacción química, hasta hacerla instantánea o casi instantánea al disminuir la energía de activación. Actúan en pequeña cantidad y se recuperan indefinidamente. No llevan a cabo reacciones que sean energéticamente desfavorables, ni tampoco modifican el sentido de los equilibrios químicos, sino que aceleran su consecución.

1.2. Características de la acción enzimática

La característica más sobresaliente de las enzimas es su elevada especificidad, que no permite que se formen subproductos y que se manifiesta como especificidad de sustrato y especificidad de acción.

- **Especificidad de sustrato.** El sustrato (S) es la molécula sobre la que la enzima ejerce su acción catalítica.
- **Especificidad de acción.** Cada reacción está catalizada por una enzima específica.

La **acción enzimática** se caracteriza por la formación de un complejo que representa el estado de transición:



donde E representa la enzima, S el sustrato, ES el complejo transitorio enzima-sustrato y P los productos de la reacción.

El sustrato se une a la enzima a través de numerosas interacciones débiles tales como puentes de hidrógeno, uniones electrostáticas, hidrofóbicas, o de van der Waals, en un lugar específico, el **centro activo**. Este centro es una pequeña

porción de la enzima, constituido por una serie de aminoácidos que interaccionan con el sustrato.

1.3. Clasificación de las enzimas

En función de su acción catalítica específica las enzimas se clasifican en grupos o clases. A cada enzima se le asigna un número compuesto por cuatro dígitos, así como un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza. Este sistema de nomenclatura y clasificación de las enzimas fue creado en el año 1961 por la Comisión de Enzimas ("Enzyme Commission", EC) de la International Union of Biochemistry (IUB). Actualmente el Comité de Nomenclatura de la IUBMB es el sucesor de la Comisión de Enzimas. El sistema E.C. agrupa a las enzimas en seis clases:

Clase 1: Oxidorreductasas

Clase 2: Transferasas

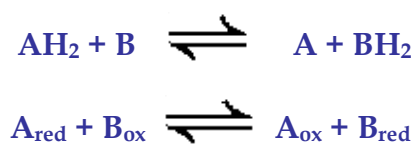
Clase 3: Hidrolasas

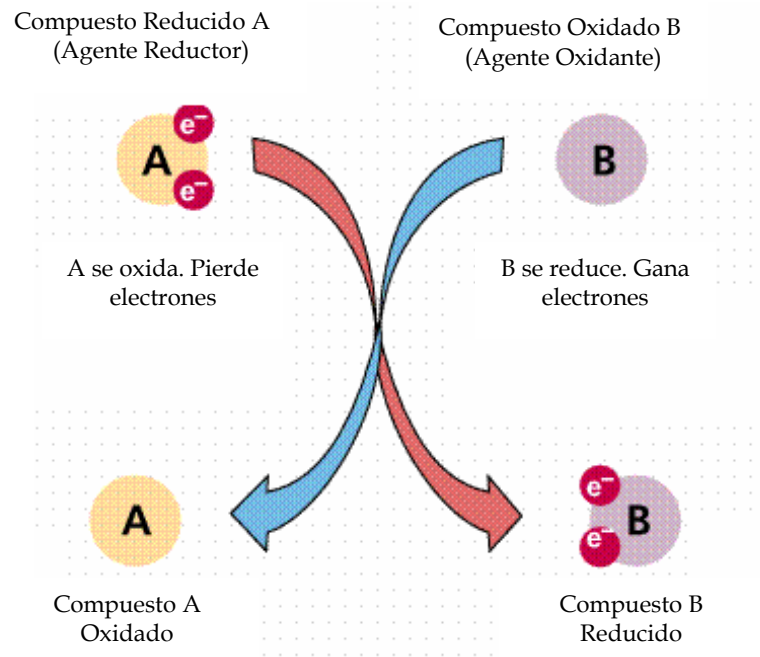
Clase 4: Liasas

Clase 5: Isomerasas

Clase 6: Ligasas

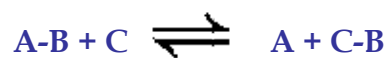
Clase 1. Las Oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidorreducción, es decir, transferencia de hidrógeno (H) o electrones (e-) de un sustrato a otro, según la reacción general:



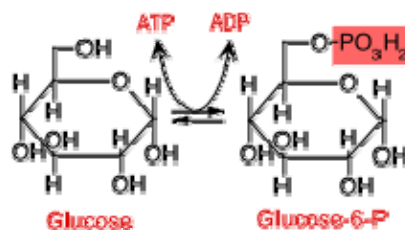


Sus funciones están básicamente relacionadas con las reacciones de óxido reducción de los organismos. Se encuentran muy comúnmente en reacciones metabólicas. Dentro de ellas existen dos subgrupos principales: Las Deshidrogenasas y las Oxidasas. Ejemplos de estas enzimas son la succinato deshidrogenasa y la citocromo oxidasa.

Clase 2. A esta clase de enzimas pertenecen las transferasas, que catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) desde un sustrato a otro, según la reacción:



Un ejemplo es la glucoquinasa, que cataliza la siguiente reacción :



Clase 3. Las hidrolasas catalizan reacciones de hidrólisis. Este grupo de enzimas permite romper moléculas de alto peso molecular, haciéndolas reaccionar con moléculas de agua. Con este método pueden romper enlaces peptídicos, ésteres o glicosídicos. La mayoría de las enzimas gástricas son de este tipo.



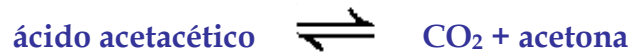
Otro ejemplo es la lactasa, que cataliza la reacción:



Clase 4. A esta clase de enzimas pertenecen las liasas, que catalizan reacciones de ruptura o soldadura de sustratos. Estas moléculas rompen enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno y carbono-azufre.



Un ejemplo es la acetacetato descarboxilasa, que cataliza la reacción:



Clase 5. Las isomerasas catalizan la interconversión de isómeros. Realizan modificaciones en una molécula, cambiando su conformación molecular, ya sea como isómero óptico, funcional o de otro tipo.



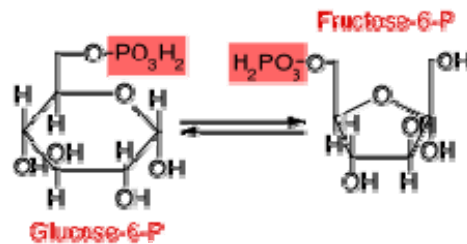
Son ejemplos de esta clase de enzimas la fosfotriosa isomerasa y la fosfoglucosa isomerasa, que catalizan las reacciones abajo representadas:

fosfotriosaisomerasa





Fosfoglucosa isomerasa



Clase 6. Las ligasas son enzimas que catalizan la unión de dos sustratos con hidrólisis simultánea de un nucleótido trifosfato (ATP, GTP, etc.):



Un ejemplo de esta clase de enzimas es la piruvato carboxilasa, que cataliza la reacción:



1.4. Hidrolasas vegetales

En los vegetales las hidrolasas están involucradas en procesos metabólicos vitales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los mismos. Muchas de estas enzimas, entre ellas proteasas, pectinasas, xilanasas, esterases, poligalacturonidasas, celulasas, son de gran interés industrial por la variedad de procesos en que pueden ser aplicadas.

La mayoría de estas enzimas se encuentran presentes en el látex de muchas especies. El látex es una de las características más salientes de las familias Asclepiadaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae y Moraceae (Rajesh *et al.*, 2005).

El látex es el fluido lechoso contenido en la o las células de los tubos laticíferos. Está compuesto por una suspensión/solución de una mezcla compleja de diferentes sustancias: enzimas, terpenos, alcaloides, vitaminas,

glúcidos, lípidos y aminoácidos libres y se han detectado componentes subcelulares, tales como núcleo, mitocondrias, ribosomas y vacuolas.

La presencia de látex ha sido reportada en al menos 12000 especies de plantas pertenecientes a 900 géneros diferentes. Las enzimas detectadas en látex, tales como proteasas y quitinasas, sugieren un rol en el mecanismo de defensa de las plantas contra patógenos, parásitos y herbívoros (Freitas *et al.*, 2007).

Las pectinasas son enzimas que digieren la pectina, sustancia presente en las paredes de las células vegetales y en la lámina media (péctica) y se emplean en el procesamiento de alimentos vegetales. La pectina es un polisacárido constituido principalmente por la unión de muchas moléculas de ácido galacturónico parcialmente metoxilado. En los extractos comerciales de pectinasas usados para la fabricación de jugos de fruta coexisten tres enzimas: pectinliasa, poligalacturonasa y pectinmetilesterasa.

Las pectinasas son fundamentalmente utilizadas en la clarificación de jugos de frutos y para evitar el sabor amargo de los mismos. Algunos jugos de frutas, como los de manzana y pera, deben tener aspecto cristalino, lo cual hace necesario aclararlos, ya que el producto obtenido por prensado es viscoso y persistentemente turbio. Los jugos de naranja o pomelo, contrariamente a los anteriores, deben llegar turbios al consumidor por lo que se usan las mismas enzimas para causar un efecto contrario al aclaramiento (con el tiempo, las pectinas de alto peso molecular tienden a precipitar, a causa del calcio presente en el jugo; si se tratan de manera controlada con pectinasas, se reduce su peso molecular, no precipitan y la turbidez del jugo se estabiliza). Por otra parte, las pectinasas se aplican en los procesos de fermentación de té y café y en la extracción de aceites (Kashyap *et al.*, 2001). Asimismo, las pectinesterasas se usan como espesantes en la industria de las mermeladas (Camperi *et al.*, 1996).

Las quitinasas catalizan la hidrólisis de quitina, un biopolímero de N-acetil-D-glucosamina. Los patrones de expresión de quitinasas en estudios *in vitro* (Meins & Ahl, 1989), de inhibición del crecimiento fúngico por quitinasas (Schlumbaum *et al.*, 1986) y la mayor resistencia de plantas transgénicas a

hongos patógenos (Broglie *et al.*, 1991) son consistentes con la hipótesis de que las quitinasas constituyen un importante componente de los sistemas de defensa de las plantas. Consecuentemente, las quitinasas vegetales son objeto de intensas investigaciones que podrían finalmente conducir a cultivos resistentes a enfermedades y disminuir el uso de pesticidas ecológicamente nocivos.

Probablemente las hidrolasas de mayor interés estén representadas por las enzimas proteolíticas, que representan casi las dos terceras partes de las enzimas que se comercializan en el mercado mundial (Barrett *et al.*, 2004). Se estima que en el mundo las industrias que aplican enzimas para sus productos invierten anualmente cerca de un billón de dólares en su comercialización, de las cuales el 75% son enzimas hidrolíticas; de este porcentaje, las proteasas representan el 60% de total de las ventas mundiales (Rao *et al.*, 1998).

La mayoría de estas enzimas proviene de fuentes microbianas, pero varias proteinasas vegetales tales como papaína, bromelaína y ficina siguen siendo preferidas en un gran número de procesos (Mantell *et al.*, 1986). Sin embargo el número de proteasas vegetales que han sido aisladas y caracterizadas es aún muy bajo (Trejo, 2005).

Tanto proteasas como pectinasas y quitinasas se encuentran formando parte del látex de muchas especies de la familia *Asclepiadaceae* (Freitas *et al.*, 2007).

1.4.1. Enzimas proteolíticas

Dentro de la clase 3 correspondiente a las hidrolasas, las enzimas proteolíticas también denominadas proteasas, proteinasas o peptidasas integran la subclase 3.4 y representan alrededor del 2% de todos los productos génicos (Barrett *et al.*, 2004). Estas enzimas se caracterizan porque catalizan específicamente la hidrólisis del enlace peptídico. Se han utilizado desde tiempos muy antiguos en un gran número de procesos biotecnológicos. Entre los más conocidos pueden citarse: la tiernización de carnes, la elaboración de cerveza, la panificación, la elaboración de quesos y la obtención de proteínas modificadas en la industria alimentaria. También se utilizan como aditivos en

polvos detergentes, en el tratamiento de efluentes industriales, en el proceso de manufactura de cueros, en la industria textil y más recientemente en la síntesis de péptidos en medios no convencionales (Uhlig, 1998, Guzmán *et al.*, 2007). Es así que debido a sus variadas aplicaciones, el interés de los investigadores por las enzimas proteolíticas de diverso origen se ha mantenido a lo largo de los años.

Se ha demostrado también que las peptidasas participan en procesos que conducen al desarrollo de enfermedades de fuerte impacto social. Por tal motivo también se ha despertado el interés por obtener o diseñar inhibidores que puedan actuar como agentes terapéuticos teniendo como "blanco" a las proteasas. Entre las principales enfermedades en las que aparecen involucradas las enzimas proteolíticas pueden mencionarse el cáncer (Coussens *et al.*, 2002), el SIDA (Baltimore *et al.*, 1998; Bartlett & Moore, 1998), el asma (Katz *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 1998, Agusti *et al.*, 1998; Mulligan *et al.*, 2000), la malaria (Rosenthal *et al.*, 1998; Dahlgren *et al.*, 2003) y el mal de Alzheimer (Maccioni *et al.*, 2001; Roberts, 2002).

Las proteasas cisteínicas tipo papaina han sido identificadas como claves en patologías relacionadas con desórdenes degenerativos, invasivos y del sistema inmune (Lecaille *et al.*, 2002; Brömme & Kaleta, 2002). La catepsina K tiene como principal acción la degradación del hueso en los osteoclastos y su inhibición selectiva puede ser beneficiosa en el tratamiento de la osteoporosis y en ciertas formas de artritis (Gowen *et al.*, 2000; Yamashita & Dodds, 2000; Hou *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la catepsina S desempeña un rol fundamental en la presentación de antígenos clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC); la inhibición de la catepsina S disminuye significativamente la respuesta a antígenos, hecho que convierte a esta enzima en un nuevo blanco para drogas contra el asma y ciertas enfermedades autoinmunes (Cimerman *et al.*, 2001; Riese *et al.*, 1998). Las catepsinas han sido también implicadas en la invasión tumoral y en las metástasis (Levicar *et al.*, 2002). Recientemente se ha desarrollado un creciente interés en el rol que juegan las proteasas cisteínicas en un amplio rango de enfermedades

parasitarias como la malaria, la enfermedad de Chagas y la esquistosomiasis (Lecaille *et al.*, 2002; McKerrow, 1999). Las proteasas cisteínicas tipo papaína cumplen en los organismos parásitos roles indispensables en el crecimiento, diferenciación celular, señalización e invasión al huésped y actúan frecuentemente como factor de virulencia, atacando al sistema inmune del huésped (Sajid & McKerrow, 2002).

Si bien las proteasas que participan en cada una de las enfermedades mencionadas son específicas, el hecho de que muchas de ellas compartan un mismo mecanismo catalítico facilita el diseño de moléculas que puedan interferir en su actividad y convertirse, en consecuencia, en potenciales fármacos para el tratamiento terapéutico de aquéllas. Ello no significa necesariamente que el mismo fármaco resulte de aplicación en enfermedades de distinta etiología, pero es obvio que en la medida en que se incremente el conocimiento de la estructura y de las características catalíticas de nuevas proteasas se dispondrá de nueva información básica que redundará en la conformación de una base de datos multipropósito en constante crecimiento. Seguramente es aquí donde debe buscarse la razón del renovado interés que se advierte en muchos grupos de investigación por el estudio de proteasas y de inhibidores de distinto origen.

1.4.1.1. Clasificación y Nomenclatura de las enzimas proteolíticas

El primer término con el que se denominó a las enzimas proteolíticas fue el de *proteasas* y surgió a finales del siglo XIX como un término general que abarcaba a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Más adelante un grupo de investigadores alemán sugirió el término *proteinasas* para denominar a aquellas proteasas que tienen como sustrato a las proteínas y *peptidasas* a aquellas enzimas que tienen como sustrato a los péptidos de menor peso molecular. Sin embargo, también fue utilizado el término *peptidasa* en un sentido más amplio, abarcando a todas las hidrolasas del enlace peptídico (Barrett, 2004). Dado que el uso del término *peptidasa* ha generado confusión, el Comité de Nomenclatura de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica

y Biología Molecular (NC-IUBMB) en el año 1984 ha recomendado el uso de este término en un sentido general para todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos. Según esta nomenclatura, las peptidasas pertenecen a la clase de las hidrolasas (EC 3) y, dentro de esta clase, a la subclase EC 3.4, que contiene las enzimas que catalizan la hidrólisis de la unión peptídica.

Según la ubicación de los enlaces hidrolizados, las peptidasas a su vez se dividen en dos grandes grupos: las *endopeptidasas* –que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína– y las *exopeptidasas* –que remueven uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino–.

Las endopeptidasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a Hartley (1960) a proponer una clasificación de las mismas basada en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos, constituyendo en la actualidad siete-subgrupos en la clasificación internacional: endopeptidasas serínicas, endopeptidasas cisteínicas, endopeptidasas aspárticas, metalo-endopeptidasas, endopeptidasas treonínicas, endopeptidasas glutámicas y endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido. Cada una de las sub-subclases de endopeptidasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, pero aún así pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (serínicas, cisteínicas y treonínicas) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas).

Schechter & Berger (1967) han propuesto un modelo conceptual para referirse a la especificidad de una peptidasa. En este modelo se consideran los residuos de aminoácido del sustrato (P) que se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser clivado hacia el N-terminal como P_1 , P_2 , P_3 , etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P_1' , P_2' , P_3' , etc. Los subsitios de la proteasa que “acomodan” los residuos del sustrato se numeran como S_1 , S_2 , S_3 y S_1' , S_2' ,

S₃', respectivamente, (Figura 1). El esquema presentado está obtenido de Turk & Guncar, 2003.

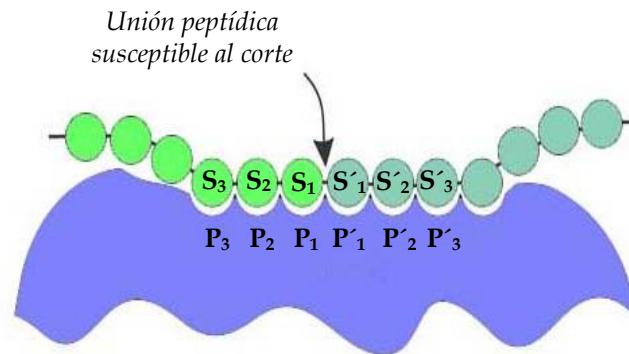


Figura 1. Interacción enzima-sustrato. Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitios del sitio activo de una peptidasa.

A la información sobre el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) se puede acceder en el sitio <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>.

A medida que un área de investigación crece se hace necesario un sistema de nomenclatura y clasificación para facilitar el manejo de toda la información y que además permita la comunicación entre las personas y el almacenamiento y búsqueda de dicha información sin ambigüedades. En este sentido los sistemas EC y MEROPS, con diferentes criterios, ordenan, clasifican y reúnen la información acerca de las peptidasas.

El sistema EC tiene la desventaja de no tener en cuenta la existencia de grupos estructurales que reflejen las relaciones evolutivas de las peptidasas miembro de cada clase; por esta causa en 1993 Rawlings & Barrett comenzaron el diseño de un sistema de clasificación de peptidasas que salva esa deficiencia y agrupa a las peptidasas teniendo en cuenta esta característica fundamental. El sistema se sigue perfeccionando durante algunos años hasta que en 1996 comienza a publicarse en la web como base de datos de proteasas MEROPS (Rawlings *et al.*, 2006, <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>) donde se encuentran más de dos mil peptidasas con número de identificación y cerca de 2500

secuencias. Este sistema de clasificación tiene en cuenta los conceptos de *tipo catalítico*, *clan*, *familia* y *peptidasa* (Tabla 1).

<i>Nivel</i>	Descripción
<i>Clan</i>	Conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un único ancestro. Las familias en el mismo clan tienen en común que las peptidasas que las integran exhiben tipos de plegamiento similares
<i>Familia</i>	Una familia incluye peptidasas que presentan homología en la secuencia aminoacídica de la región encargada de la actividad enzimática
<i>Peptidasa</i>	Una peptidasa es un grupo de proteínas que muestran una actividad proteolítica particular y que están muy estrechamente relacionadas en secuencia

Tabla 1. Sistema MEROPS de clasificación de peptidasas.

El concepto de tipo catalítico de una peptidasa depende de la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis (Barrett *et al.*, 2004).

En los clanes y familias se agrupan peptidasas homólogas. Un clan contiene una o más familias de peptidasas que muestran tener un origen común, es decir que están relacionadas evolutivamente. La evidencia más clara de homología en el nivel de clan está dada por la similitud en la estructura terciaria. En las familias, las peptidasas están agrupadas en base a la homología de su secuencia aminoacídica, particularmente en la zona de la molécula responsable de la actividad enzimática (Barrett *et al.*, 2004).

La mayoría de los clanes están formados por peptidasas de un solo tipo catalítico, tal el caso del clan CA, formado por varias familias de peptidasas cisteínicas. La primer peptidasa reconocida como de tipo cisteínico fue papaína,

prototipo de la familia C₁ y del clan CA. Casi todas las peptidasas cisteínicas de origen vegetal pertenecen a la familia C₁.

1.4.1.2. Mecanismos catalíticos de las endopeptidasas

1.4.1.2.1. Peptidasas serínicas y treonínicas

Esta clase de peptidasas comprende dos familias distintas: la familia de la quimotripsina que incluye enzimas de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastasa), plantas y microorganismos y la familia de la subtilisina, que si bien en un principio se creyó constituida solamente por enzimas bacterianas (ejemplo: subtilisina), actualmente se han encontrado representantes en otros microorganismos, en plantas y en animales superiores. Si bien la estructura general tridimensional es diferente en las dos familias, ambas tienen la misma geometría de sitio activo y en consecuencia catalizan las reacciones con el mismo mecanismo. Las proteinasas serínicas exhiben diferentes especificidades de sustrato, relacionadas con las sustituciones de aminoácidos en varios subsitios enzimáticos que interactúan con los residuos de los sustratos. Algunas enzimas tienen un amplio sitio de interacción con el sustrato, mientras que otras tienen una especificidad restringida al residuo P₁ del sustrato.

La actividad de las mismas suele ser máxima a valores de pH alcalinos y no requieren activadores, aunque los iones calcio intervienen en la activación de algunas proenzimas y estabilizarían a algunas enzimas.

Si bien estas enzimas son las más estudiadas en el campo de las proteasas, son relativamente pocas las que se conocen dentro de los vegetales. Entre ellas pueden citarse cucumisina, aislada de *Cucumis melo* L. var. Prince (Kaneda & Tominaga, 1975; Kaneda *et al.*, 1995; Uchikoba *et al.*, 1995); macluralisina obtenida de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Rudenskaya *et al.*, 1995); taraxalisina extraída de *Taraxacum officinale* Webb s.l. (Rudenskaya *et al.*, 1998), cryptolepaína purificada y caracterizada a partir de *Cryptolepis Buchanan* (Pande *et al.*, 2006), carneína de *Ipomoea carnea* (Patel *et al.*, 2007) y wrightiaína, una proteasa estable aislada del látex de *Wrightia tinctoria* (Tomar *et al.*, 2008). También fueron estudiadas las enzimas obtenidas a partir de *Benincasa cerifera* (Kaneda &

Tominaga, 1977), de *Trichosantes cucumeroides* Maxim. (Kaneda *et al.*, 1986), *Trichosantes bracteata* (Lam.) Voigt (Kaneda & Uchikoba, 1994), de *Cucurbita ficifolia* (Curotto *et al.*, 1989), de *Synadenium grantii* Hook, 'f'. (Menon *et al.*, 2002), de *Euphorbia supina* (Arima *et al.*, 2000) y *Euphorbia milii* (Yadav *et al.*, 2006), de *Melothria japonica* (thumb) Maxim (Uchikoba *et al.*, 2001) y de *Cucumis trigonus* Roxburghi (Asif-Ullah, *et al.* 2006), entre otras.

1.4.1.2.2. Peptidasas cisteínicas

Esta clase incluye las proteasas vegetales más extensamente estudiadas, tales como papaína, ficina, actinidina o bromelaína, varias catepsinas de mamíferos, calpaínas citosólicas y algunas proteasas de parásitos como las de *Trypanosoma*. La mayoría de las peptidasas de esta clase están incluidas dentro de la familia de la papaína, que es la enzima cisteínica más ampliamente estudiada, responsable de los principales avances no solamente en el campo de las proteinasas cisteínicas sino en la enzimología en general. Ha sido la primera proteinasa cisteínica a la que se le determinó la estructura tridimensional (Drenth *et al.*, 1968), por lo que es considerada como el arquetipo de esta clase de peptidasas.

Actualmente se sabe que estas peptidasas se sintetizan en los polisomas del citoplasma como un precursor o propéptido N-terminal de corta longitud y otro C-terminal más largo. Esta proenzima inactiva se dirige al lumen del retículo endoplasmático y luego es transportada a las vacuolas o a la pared celular que constituyen su destino final. La mayoría de las proteínas solubles de las plantas poseen una secuencia señal a nivel del C-terminal reconocida por un receptor del aparato de Golgi (Okamoto *et al.*, 2003) y luego transportada por la red trans Golgi. Sin embargo, ciertas peptidasas de la familia de la papaína tienen una secuencia señal de retención al retículo endoplasmático y así, son transportadas en grandes vesículas que emergen del retículo y se fusionan directamente con las vacuolas almacenadoras de proteínas, sin pasar por el Aparato de Golgi, (Okamoto *et al.*, 2003). Finalmente, cuando se remueven las secuencias C y N-terminales del propéptido en estas vacuolas adoptan la conformación nativa

que es la estructura química con capacidad de cumplir su función biológica (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

Al igual que en las proteasas serínicas, la catálisis ocurre a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo cisteína y un residuo histidina. La Cisteína 25 y la Histidina 159 (de acuerdo a la numeración de papaína) juegan el mismo rol de la Serina 195 y de la Histidina 57, respectivamente. El nucleófilo en este caso no es un grupo $-OH$, sino un ion tiolato que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la Histidina 159. Siendo el nucleófilo atacante el par iónico tiolato-imidazol en ambas etapas, no se requiere una molécula de agua. La cisteína catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutras y dipolar (zwitterion). Se cree que el sulfuro aniónico está involucrado directamente en un ataque nucleofílico en el carboxilo del sustrato. La ruptura del mismo implica el ataque del agua catalizado por la enzima.

Dado que estas enzimas son inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilo por conversión en puentes disulfuro y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores, se las denominó “tiolproteinasas” (Hartley, 1960). Considerando que el único aminoácido que posee un grupo sulfhidrilo (tiol) en la cadena lateral es la cisteína, se sugirió sustituir el término “tiolproteinasas” por el de “proteinasas cisteínicas” (NC-IUBMB, 1984) (Figura 2, esquema tomado de <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>).

Como ejemplos de peptidasas cisteínicas vegetales se pueden citar a las aisladas de *Carica papaya* (Azarkan *et al.*, 2003, Azarkan *et al.*, 2006), de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001), de *Araujia angustifolia* (Obregón *et al.*, 2006), de *Melia azedarach* (Uchickoba *et al.*, 1999), de *Calotropis gigantea* (Rajesh *et al.*, 2005), de *Bromelia hieronymi* Mez (Bruno *et al.*, 2003, Bruno *et al.*, 2006, Bruno, 2007), de *Bromelia balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2001), de *Bromelia pinguin* (Abreu Payrol *et al.*, 2005, Abreu Payrol *et al.*, 2007), de *Bromelia fastuosa* (Cabral, 2006), de *Funastrum clausum* (Morcelle del Valle *et al.*, 2004a;

Morcelle del Valle, 2004 b), de *Asclepias curassavica* (Liggieri, et al. 2004, Liggieri, 2005), de *Phillibertia gilliesi* (Sequeiros et al., 2005; Sequeiros, 2006), de *Carica candamarcensis* (Pereira, et al., 2001), de *Calotropis procera* (Freitas et al., 2007) y *Vasconcellea spp.* (Kyndt et al., 2007) entre otras.

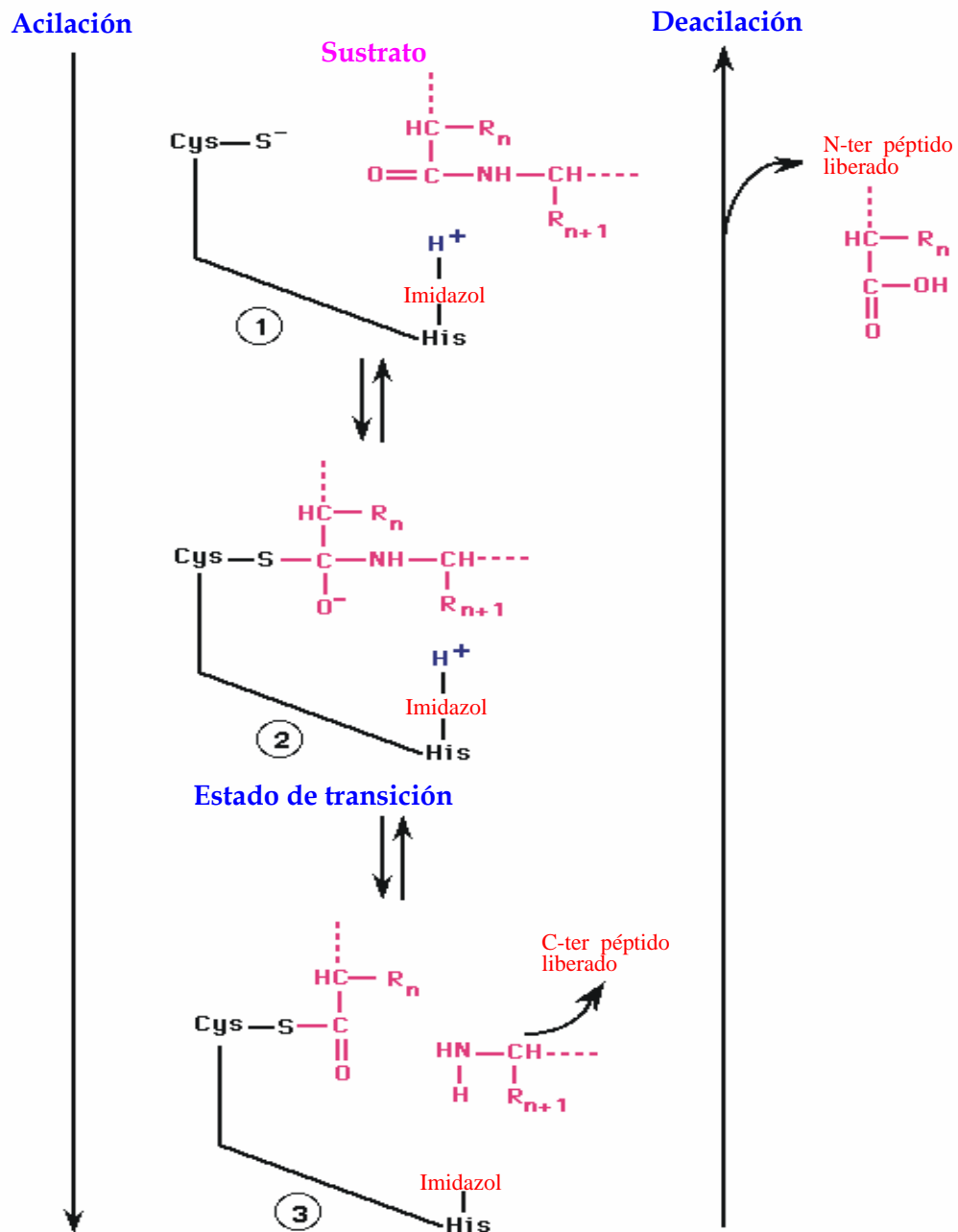


Figura 2. Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas.

1.4.1.2.3. Peptidasas aspárticas

La mayoría de las proteinasas aspárticas estudiadas pertenecen a la familia de la pepsina. Esta familia incluye enzimas digestivas tales como pepsina y quimopepsina, catepsina D y algunas proteasas fúngicas. Una segunda familia incluye proteínas virales tales como la proteasa del virus del SIDA, llamada retropepsina.

Estudios cristalográficos permitieron mostrar que estas enzimas son moléculas constituidas por dos lóbulos homólogos, con el sitio activo localizado entre ambos. Cada lóbulo contribuye con un residuo aspártico de la díada activa de aspartatos. Estos dos residuos aspárticos están geométricamente muy próximos en la molécula activa y uno sólo de ambos aspartatos es ionizado en el rango de pH óptimo (2-3). Por actuar en forma óptima a bajos valores de pH estas proteinasas también fueron denominadas “proteinasas ácidas” por Hartley (1960).

Las proteasas aspárticas vegetales conocidas han sido aisladas y caracterizadas a partir de hojas, flores y semillas de diferentes especies. Entre ellas podemos mencionar phytepsina aislada a partir de especies de *Arabidopsis*, *Brassica*, *Centaurea*, *Cynara*, *Hordeum*, *Lycopersicum*, *Orysa* y *Vigna*, (Kervinen, 1998, A. Kulkarni & M. Rao, 2007) además de cyprosina obtenida a partir de *Centaurea calcitrapa* y de *Cynara cardunculus* (Cordeiro *et al.*, 1998) y cardosina A (Pires, 1998a) y cardosina B (Pires, 1998b) aisladas de *Cynara cardunculus*. Recientemente se aisló otra proteasa aspártica de la especie *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Vairo Cavalli, 2005). Por otra parte, recientemente se ha caracterizado una proteasa aspártica de *Arabidopsis* implicada en procesos de defensa (Simões *et al.*, 2007).

Estas enzimas pueden ser monoméricas o heterodiméricas, conteniendo dos péptidos procesados a partir del mismo precursor proteico. Las proteinasas aspárticas de los vegetales son generalmente secretadas o bien destinadas al compartimento vacuolar. La secuencia primaria de algunas de estas enzimas ha sido determinada y presentan un alto grado de identidad con las de origen animal y microbiano; sin embargo, las proteinasas aspárticas vegetales tienen

una región muy específica que no se encuentra en animales, microorganismos o proteinasas virales. Si bien la función de esta región no ha sido aún elucidada se ha propuesto una función en el procesamiento o degradación de proteínas, aunque se requerirían más estudios para confirmar su función *in vivo*. Resultados más recientes sugieren posibles roles en la muerte celular programada de los tejidos y en la resistencia a los patógenos (Mutlu & Gal, 1999).

1.4.1.2.4. Metalopeptidasas

Las metaloproteinasas se encuentran entre las hidrolasas en las cuales el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado por una molécula de agua. Esta es una característica compartida con las proteasas aspárticas, pero en las metaloproteasas un catión metálico divalente, usualmente cinc, aunque algunas veces cobalto, níquel o manganeso, activan la molécula de agua. El ión metálico es generalmente sostenido por tres aminoácidos ligandos.

Estas proteinasas se dividen en dos grandes grupos dependiendo del número de iones metálicos requeridos para la catálisis. En varias metaloproteasas se requiere solamente un ión cinc, pero en algunas son dos los iones metálicos que actúan cocatalíticamente. Todas aquellas en las que son esenciales cobalto o manganeso, se requieren dos iones metálicos, aunque hay familias dependientes de cinc en las que también dos iones son cocatalíticos. En las proteinasas con iones metálicos cocatalíticos, solamente cinco residuos aminoacídicos actúan como ligandos, siendo uno de ellos el que liga a ambos iones. Todas las metaloproteinasas con iones metálicos cocatalíticos son exopeptidasas, mientras que las metaloproteinasas con un ion metálico catalítico pueden ser exo- o endopeptidasas. Los ligandos conocidos son Histidina, Glutamina, Aspártico o Lisina.

Estas enzimas difieren ampliamente en sus secuencias y en sus estructuras pero la gran mayoría contiene un átomo de cinc catalíticamente activo. En algunos casos, el cinc puede ser reemplazado por otro metal como cobalto o níquel sin pérdida de la actividad. La termolisina bacteriana ha sido bien

caracterizada y su estructura cristalográfica indica que el zinc está unido por dos histidinas y un ácido glutámico.

Varias enzimas contienen la secuencia HEXXH, la cual provee dos ligandos histidinas para el cinc mientras el tercer ligando es tanto ácido glutámico (termolisina, neprilisina, alanilaminopeptidasas) o una histidina (astacina). Otras familias exhiben un modo diferente de unión al átomo de cinc. Las metalopeptidasas constituyen el grupo de enzimas proteolíticas menos estudiado en los vegetales. Existen solamente unas pocas referencias sobre la presencia de esta clase enzimas en semillas de *Cucurbita pepo* (Hara & Matsubara, 1980), de soja: *Glicine max* (Bond & Bowles, 1983), de *Canavalia ensiformis* (Dalkin *et al.*, 1983) y de *Fagopyrum esculentum* (Belozersky *et al.* 1990). Recientemente se han aislado de *Arabidopsis thaliana* (Chabregas, 2003).

1.4.1.2.5. Peptidasas glutámicas

Las proteasas glutámicas en un principio fueron denominadas "carboxilpeptidasas insensibles a la pepstatina". Son similares a las aspárticas, de origen fúngico y pertenecen a la denominada familia G1. La importancia de los residuos glutámico 136 ("E") y glutamina 53 ("Q") en el sitio activo de estas proteasas llevó a proponer el término "familia EQolisina" para referirse a las mismas. El mecanismo sugerido es un ataque nucleofílico por una molécula de agua activada por la cadena lateral del glutámico 136 formando el intermediario tetraédrico con el átomo de C del enlace peptídico que se escinde. La asistencia electrofílica y la estabilización del oxianión son provistas por la amida de la Glutamina 153. (Fujinaga *et al.*, 2004).

1.4.1.2.6. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido

Existe un número de peptidasas para las cuales el mecanismo catalítico no se ha elucidado. Aquellas sobre las cuales se conoce la secuencia de aminoácidos se han denominado con la letra "U" ("unclassified") sin considerar el mecanismo catalítico y se les asigna además un número arbitrario, por ejemplo

Familia U28 que contiene dipeptidasa E de *Escherichia coli*. Las bases de datos muestran 20 familias de peptidasas no clasificadas (Barrett, *et al.*, 2004).

1.5. Proteasas de látex

En el curso de su desarrollo todas las células recambian proteínas y por lo tanto contienen enzimas proteolíticas para cumplir dicha función. Generalmente estas proteasas se encuentran en cantidades relativamente bajas y son frecuentemente difíciles de detectar si no se emplean sustratos muy sensibles. Sin embargo, algunas especies de plantas poseen gran concentración de proteasas en ciertos tejidos. Un ejemplo de ello es el látex obtenido a partir de plantas de diversas familias en el que las enzimas proteolíticas superan el 50% de las proteínas totales. En estos casos la actividad proteolítica es por lo menos superior en dos órdenes de magnitud a la encontrada en otros tejidos. La abundancia de estas proteasas por sobre los requerimientos para el crecimiento y el desarrollo celular indican que podrían actuar como "aleloquímicos" (Dalling, 1986; Kono *et al.*, 2004).

Proteasas cisteínicas de látex de frutos tales como papaína y ficina son conocidas por digerir la cutícula de los nematodos y presentar baja toxicidad, por lo que se utilizan desde hace tiempo en el tratamiento gastrointestinal de infecciones por nematodos tanto en animales como en el hombre (Stepenk *et al.*, 2004).

1.5.1. Proteasas de látex de *Asclepiadaceae*

En el año 1811 Robert Brown separó la familia *Asclepiadaceae* de *Apocynaceae* (Jussieu, 1789). Sin embargo, a raíz de recientes trabajos sobre teorías filogenéticas basadas en el análisis de ADN, se han fusionado nuevamente como *Apocynaceae* (Endress & Bruyns, 2000) siendo *Asclepiadaceae* considerada en la actualidad por muchos autores como la subfamilia *Asclepiadoideae*. Si bien esto ha sido aceptado por muchos investigadores, no hay aún unanimidad de criterios en tal sentido, por lo que en el presente trabajo se considerará como familia *Asclepiadaceae*.

Los primeros trabajos en cuanto a la detección de proteasas en el látex de esta familia datan del año 1940 en que Winnick y colaboradores aislaron del látex de *Asclepias speciosa* una proteinasa cisteínica a la que denominaron asclepaína s. En el mismo año Greenberg & Winnick (1940) obtuvieron una enzima de iguales características a partir del látex de *Asclepias mexicana* (asclepaína m), ambas con máxima actividad a pH 7,5 frente a hemoglobina desnaturalizada y ovalbúmina como sustratos.

Poco tiempo después Carpenter & Lovelace (1943) determinaron que el pI de una proteasa aislada de *Asclepias syriaca* es de 3,1. El látex de esta especie fue sometido a posteriores estudios (Brockbank & Lynn, 1979; Lynn *et al.*, 1980), que revelaron la existencia de al menos dos tipos de proteasas, cada una de ellas con múltiples formas que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos, su pH óptimo (7 y 8,5) y su peso molecular (21 y 23 kD), aún cuando su comportamiento frente a la cadena β de insulina muestra una especificidad similar. Barragán *et al.* (1985); y Tablero *et al.* (1991) estudiaron las distintas formas moleculares de proteasas presentes en el látex de *Asclepias glaucescens*, que no difieren significativamente de las encontradas en las anteriores especies: si bien el pI varía entre 3,6 y 9,2, las proteasas más abundantes (de pI superior a 9) tienen un peso molecular de 23 kD y su estructura secundaria es muy similar a la de papaína.

Del látex de *Calotropis gigantea* se aislaron inicialmente dos cisteinilproteasas (Abraham & Joshi, 1979a, 1979b), denominadas calotropina FI y calotropina FII; se trata de glicoproteínas de parecido peso molecular (23-27 kD) que muestran dos valores óptimos de pH sobre hemoglobina (4,3 y 8,1) y similar composición aminoacídica. Un estudio posterior (Pal & Sinha, 1980) reveló la existencia de dos proteinasas adicionales (calotropinas DI y DII) que pudieron cristalizarse y que poseen un único máximo de actividad frente a azoalbúmina (pH 7,5-8,0); su peso molecular está dentro del mismo rango (24 kD) pero su composición aminoacídica difiere de las anteriores. A partir de *Calotropis procera* se ha aislado proceraína (Kumar Dubey & Jagannadham, 2003), una proteasa cisteínica de 28,8 kDa y pI 9,32 que es capaz de hidrolizar N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-

nitroanilida pero no N-succinil-L-Ala-Ala-p-nitroanilida, N-succinil-L-Ala-p-nitroanilida ni N-d-Benzoil DL-Arg-p-nitroanilida; la enzima no está glicosilada, tiene el N-terminal bloqueado y contiene 8 residuos de triptofano, 20 de tirosina y 7 de cisteína. En estudios más recientemente se analizó el perfil enzimático del látex de *Calotropis procera* (Freitas *et al.*, 2007) detectándose que la mayor actividad proteolítica es debida a la presencia de al menos cuatro proteinasas cisteínicas a las que le asignan el rol de defensa que posee el látex en las plantas.

Posteriormente se purificaron y caracterizaron varias peptidasas a partir del látex de otras especies de *Asclepiadaceae*. A partir del látex de *Araujia hortorum* Fourn. mediante cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharosa CL 6B) se han purificado tres endopeptidasas cisteínicas: araujaína h I, h II y h III, cuyos pesos moleculares son 24,0 kD, 23,7 kD y 23,5 kD, respectivamente; las tres mostraron preferencia por el derivado de Gln para sustratos del tipo N α -CBZ-aa-p-nitrofeniléster y un perfil de pH sobre caseína con máximo de actividad entre pH 8,0 y 9,0. Araujaína h I y h III tienen pI > 9,3, mientras que araujaína h II tiene un pI algo más bajo (8,9). La secuencia N-terminal de araujaína h II reveló un 68% de identidad con quimopapaína y un 59% con araujaína h III, en tanto que araujaína h I tiene el N-terminal bloqueado (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001). Funastraína c II fue aislada a partir del látex de *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlechter por cromatografía de intercambio iónico, utilizando SP-Sepharosa FF, su peso molecular es de 23,6 kD y su pI > 9,3. Se determinó el pH óptimo sobre caseína (pH 9,0-10,0) y empleando PFLNA (Filippova *et al.*, 1984) (pH 6,8); con este sustrato el valor de Km fue 0,1011 mM y kcat 0,9 s⁻¹. La secuencia N-terminal tiene 75% de identidad con asclepaína a y 71% con asclepaína b (ambas enzimas de *Asclepias syriaca*) y 70% con araujaína h III (Morcelle *et al.*, 2004b). Del látex de *Asclepias curassavica* L. también se ha aislado por cromatografía de intercambio iónico utilizando SP-Sepharosa FF una endopeptidasa cisteínica denominada asclepaína c I, que posee un pI > 9,3, un peso molecular de 23,2 kD, manifiesta preferencia por el derivado de Gln para sustratos del tipo N α -CBZ-aa-p-nitrofeniléster y un valor de Km 0,818 mM frente a PFLNA (Liggieri *et al.*, 2004).

También se han estudiado dos especies pertenecientes al género *Morrenia*: *M. brachystephana* Griseb. (Vairo Cavalli *et al.*, 2003) y *M. odorata* (Hook *et Arn.*) Lindley; del látex de *M. brachystephana* se aislaron morrenaína b I y b II, que difieren en cuanto a su preferencia sobre sustratos del tipo N α -CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster (morrenaína b I mostró mayor afinidad para el derivado de Asp, mientras que morrenaína b II hizo lo propio con el derivado de Gly); la secuencia N-terminal de morrenaína b I muestra un 73% de identidad con araujaína h II y sólo un 47% de identidad con morrenaína b II. Morrenaína o II fue obtenida a partir del látex de *M. odorata*; su N-terminal tiene un 95% de identidad con el de morrenaína b II, ambas tienen un pI > 9,3 pero difieren en los valores de Km y kcat frente a los derivados N α -CBZ-aa-*p*-nitrofeniléster de Ala, Asp y Gly (Vairo Cavalli *et al.*, 2001). Recientemente se ha demostrado la presencia de varias proteasas en el látex de *Philibertia gilliessi* Hook. *et Arn.* (Sequeiros *et al.* 2005) y se ha purificado una de ellas denominada philibertaína g I, que es una endopeptidasa cisteínica básica (pI > 10,25), con un peso molecular de 23,5 kD que hidroliza al PFLNA (Km 0,15 mM) y cuya secuencia N-terminal tiene un 73% de identidad con la de caricaína (proteasa de *Carica papaya*).

A partir del látex de *Ervatamia coronaria* se han purificado y caracterizado tres proteasas cisteínicas, llamadas ervatamaína A, B y C. Ervatamaína B y C fueron cristalizadas en el año 1999 y se les determinó la estructura cristalográfica preliminar con una resolución de 2,5 y 2,6 Å, respectivamente (Chakrabarti *et al.* 1999).

Ervatamaína A (Nallamsetty *et al.*, 2003) exhibe alta actividad proteolítica frente a sustratos naturales y amidolítica frente a sustratos sintéticos, posee una masa molecular de 27,6 kD y su pI es 8,37. En su molécula hay 11 residuos de tirosina, 8 de triptofano y 7 de cisteína. La secuencia N-terminal muestra los aminoácidos típicamente conservados en las proteasas cisteínicas.

Ervatamaína B ha sido purificada por cromatografía de intercambio iónico y cristalización (Kundu *et al.*, 2000), su pI es 9,35 y la masa molecular fue estimada en 26 kD por SDS-PAGE y gel filtración. Posee 7 residuos de

triptofano y 10 de tirosina por molécula y sólo 2 puentes disulfuro, en lugar de los tres típicos de las proteasas cisteínicas. La enzima hidroliza sustratos naturales desnaturalizados como caseína, azoalbúmina y azocaseína con alta actividad específica, además de mostrar actividad amidolítica frente a N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida con un valor de K_m 6,6 mM. Se estudiaron los cambios conformacionales inducidos en dicha enzima por el agregado de diferentes alcoholes e incrementos de temperatura (Kundu *et al.*, 2002). En un trabajo posterior (Biswas *et al.*, 2003) se determinó la estructura cristalográfica de ervatamaína B con una resolución de 1,63 Å, se pudo inferir su estructura primaria y se detectaron varias sustituciones con respecto a papaína que justifican la alta estabilidad de esta enzima, así como su especificidad de sustrato.

Ervatamaína C (Thakurta *et al.*, 2004) es una enzima muy estable que ha sido cristalizada y de la cual se ha determinado su secuencia. Si bien la estructura tridimensional en general es similar a la de los otros miembros de la familia de la papaína, presenta la sustitución de algunos residuos de aminoácidos que normalmente están conservados tanto en los dominios L y R como en la región de la hendidura del interdominio. Estas sustituciones provocarían un incremento en el número de interacciones (puente de H) intra e interdominios, fortaleciendo la estructura de ervatamaína C. Por otra parte se ha identificado en el dominio R una única unión disulfuro, en contraposición a las tres conservadas en la familia de la papaína. Todos estos factores contribuyen a un aumento en la estabilidad de ervatamaína C. En esta enzima, la naturaleza del subsitio S2, que es el primer determinante de especificidad de estas proteasas, es similar a papaína, pero en el subsitio S3 Ala reemplaza a un residuo aromático y tiene el efecto de eliminar las interacciones hidrofóbicas requeridas para la estabilización de S3-P3. Esto explicaría la menor actividad de ervatamaína C para sustratos o inhibidores pequeños. Esta sustitución, sin embargo, no afecta significativamente la unión de sustratos proteicos naturales desnaturalizados a la enzima, porque existen varias interacciones adicionales enzima-sustrato fuera de la hendidura del sitio activo.

A partir del látex de *Ervatamia heyneana* ha sido purificada una nueva peptidasa cisteínica muy estable y con alto contenido de cisteínas (Patel & Jagannadham, 2003); la enzima tiene una masa molecular de 23 kD, su pI es 10,8 y posee 11 residuos de cisteína.

Más recientemente, en el látex de *Vasconcellea spp.* se detectó elevada actividad proteolítica debida a la presencia de una alta concentración de proteasas cisteínicas que al ser secuenciadas a partir de sus cADN mostraron elevada homología con otras proteasas cisteínicas provenientes de diferentes especies de *Caricaceae* (Kindt *et al.*, 2007).

2. INTRODUCCIÓN AL MUNDO DE LAS “ÓMICAS”

El avance de la genética molecular y celular y el poder de las tecnologías de la información ha permitido que la genómica, junto con la bioinformática, estén generando catálogos completos de todos los genes, además de su localización y función. Este avance de la ciencia ha sido exponencial en los últimos 30 años.

Las aproximaciones tradicionales para aislar genes de plantas implicaban la utilización de técnicas moleculares y genéticas, incluyendo la prospección de genotecas, clonación basada en la homología y el mapeo, así como la selección de mutantes fisiológicos y de desarrollo. La mayoría de estas estrategias experimentales van encaminadas a la caracterización de un solo gen y su aislamiento es un prerrequisito para llevar a cabo cualquier estudio posterior. Sin embargo, actualmente es cada vez más frecuente arrancar un proyecto de investigación con una secuencia de ADN encontrada en una base de datos y se pueden identificar nuevos genes por búsqueda directa en las bases de datos en virtud de su similitud con genes conocidos, una aproximación bioinformática análoga a la prospección de una genoteca usando hibridación con sondas de ácidos nucleicos. Las iniciativas genómicas y los recursos de la internet que contienen información de secuencias han cambiado en forma drástica la biología experimental en plantas, proporcionando a los investigadores nuevos caminos para el descubrimiento de genes. El gran tamaño de muchos de los

genomas de plantas hace que esta aproximación se haya limitado, sin embargo, a unas pocas especies.

Con el aumento de secuencias de genes en las bases de datos se ha producido una explosión en la aplicación de herramientas a gran escala para analizar perfiles de expresión en los sistemas biológicos. La capacidad de analizar cualitativa y cuantitativamente poblaciones de ARNm (transcriptómica) y proteínas (proteómica) suscita la tentadora posibilidad de descifrar las rutas reguladoras y funcionales que representan el puente entre el genotipo y el fenotipo.

El término proteómica se está convirtiendo en algo ambiguo que engloba casi cualquier aspecto de la expresión de proteínas, el estudio de su estructura o su función. Sin embargo, en términos generales, deberíamos definirlo como el estudio del perfil del conjunto de proteínas complementarias del genoma que sería análogo al perfil de transcritos en una situación dada. A diferencia de los estudios de transcriptómica en los que el ARN se extrae y manipula con facilidad, los estudios con proteínas presentan múltiples desafíos: su heterogeneidad fisicoquímica y complejidad estructural, lo que complica su extracción, solubilización, manejo, separación e identificación. Además, no existe ningún tipo de tecnología similar a la PCR que permita amplificar aquellas proteínas que son poco abundantes. Algunos de estos problemas son particularmente críticos cuando se trabaja con tejidos vegetales. Existen bases de datos disponibles que contienen datos sobre perfiles de proteínas. La segunda categoría en el análisis de proteómica es la llamada proteómica comparativa, donde el objetivo no es ya identificar todas las proteínas presentes en una situación concreta, sino caracterizar las diferencias entre distintas poblaciones de proteínas en dos situaciones biológicas diferentes.

Aunque gran parte del esfuerzo en proteómica se ha realizado en la puesta a punto de métodos de alta resolución para separar e identificar proteínas, uno de los pasos críticos es la extracción y preparación de muestras. Los tejidos vegetales son usualmente más complicados a la hora de preparar extractos de proteínas que otras fuentes biológicas. Tienen menor contenido de proteínas,

usualmente contienen más proteasas y otros compuestos que interfieren en la estabilidad de las proteínas —polisacáridos, lípidos y compuestos fenólicos—, además de toda una colección de metabolitos secundarios que pueden interferir no sólo en el proceso de extracción, sino también en el fraccionamiento y posterior análisis.

Finalmente, la metabolómica aparece como una nueva herramienta funcional de la genómica que contribuye a la comprensión de las complejas interacciones moleculares en los sistemas vivos. Al ser una de las últimas ómicas aparecidas, presenta todavía muchos campos metodológicos que se pueden y se deben mejorar antes de que aparezcan bases de datos que nos permitan integrar las concentraciones de metabolitos con el resto de recursos de la genómica. El puente necesario que debe existir entre la metabolómica y las otras aproximaciones de la genética funcional: transcriptómica y proteómica, permitirá el desarrollo de bases de datos que almacenen, integren, relacionen y permitan establecer relaciones causales entre genes, transcritos, proteínas y metabolitos.

Los metabolitos de las plantas están implicados en muchas de las respuestas de resistencia al ataque de patógenos, en condiciones de estrés y contribuyen al color, sabor y olor de flores y frutos. El fenotipo bioquímico de una planta es el resultado de la interacción entre el genotipo y el entorno. Por tanto, se necesita identificar y cuantificar los metabolitos para estudiar la dinámica del metaboloma y analizar los flujos metabólicos. El reto de la metabolómica reside en encontrar cambios en las cantidades de metabolitos que se puedan correlacionar con el estado fisiológico y de desarrollo de una célula, de un tejido o de un organismo.

Para obtener un conocimiento global de cómo funciona un sistema biológico es esencial saber cómo responde utilizando los tres niveles de expresión, lo que permitirá deducir asociaciones relevantes entre macromoléculas, identificar correlaciones funcionales con fenotipos y construir modelos que describan de forma cuantitativa la dinámica de un sistema biológico. Estos análisis fenotípicos a gran escala permitirán en un futuro predecir como será el

comportamiento de una planta dada en un determinado contexto medioambiental (<http://www.encuentros.uma.es/encuentros100/omicas.htm>).

2.1. Biología molecular

La biología molecular es una disciplina de la bioquímica que estudia, entre otras, las moléculas de ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). El origen de la biología molecular se puede rastrear hasta fines del siglo XIX; sin embargo, el descubrimiento de la estructura del ADN se considera como el inicio de esta disciplina (Watson & Crick, 1953). Los avances producidos por la biología molecular en la década del '60 nos permiten contar hoy con herramientas para el estudio de microorganismos a nivel molecular. En particular, el aislamiento de la ADN polimerasa y las propiedades de hibridación del ADN son algunos de los conocimientos que son aplicados hoy día en la reacción en cadena de la polimerasa, así como muchas otras reacciones que se han transformado en herramientas útiles para el estudio de material biológico a nivel molecular.

2.1.1. Hitos en el desarrollo de la biología molecular

El aislamiento de la molécula de ADN se realizó por primera vez en 1869, a partir de núcleos aislados de linfocitos humanos y se denominó "nucleína". Posteriormente se demostró que la nucleína estaba compuesta por 4 bases orgánicas, adenina, guanina, timina y citosina. El desarrollo de un marcador químico a principios del siglo XX demostró por microscopía óptica que el ADN se encuentra en el núcleo de todas las células de distintas especies. En 1944 Avery *et al.* demostraron que en el ADN estaba la información responsable de la herencia. Sin embargo, este descubrimiento no tuvo mayor impacto en su época ya que en ese momento se creía que el contenido de las cuatro bases era similar en todas las moléculas de ADN y por lo tanto no explicaba la diversidad genética (Freifelder, 1978). En 1950 Chargaff demostró que la composición química del ADN variaba enormemente entre un organismo y otro, y que a pesar de ello, siempre existía una concentración molar equivalente entre

adenina-timina y citosina-guanina.

En 1953, basándose en este descubrimiento y utilizando datos de difracción de rayos X, Watson y Crick propusieron el modelo de doble hebra para la estructura del ADN (Watson & Crick, 1953; Fierro, 2001).

En este modelo las bases nitrogenadas de cada hebra forman una cadena unida por grupos fosfatos externos e internamente las bases interactúan con las respectivas bases complementarias (adenina-timina y citosina-guanina) de la otra hebra a través de enlaces de hidrógeno. El descubrimiento de Watson y Crick permitió conocer la estructura del ADN y comprender el mecanismo de la herencia, en el que cada hebra sirve de molde para su propia replicación (replicación semiconservativa) y es considerado como el inicio de la biología molecular (Fierro, 2001).

En 1960, Kronberg aisló y purificó la enzima responsable de la replicación del ADN, la ADN polimerasa (Alberts *et al.*, 1994). El descubrimiento de esta enzima permitió definir elementos críticos para la síntesis de la molécula de ADN, en particular el sitio de inicio de la síntesis formado por ADN de doble hebra. Este descubrimiento es la base para todos los métodos de síntesis de ADN *in vitro* como la reacción en cadena de la polimerasa .

Ese mismo año, Doty *et al.* descubrieron las propiedades de hibridación del ADN. Contrariamente a lo pensado en esa época, que la separación por calor del ADN doble hebra (denaturación) era un fenómeno irreversible, estos investigadores observaron que si el ADN desnaturalizado era llevado a 65 °C, se volvía a formar ADN doble hebra. Estos autores denominaron a este fenómeno "renaturación" o "hibridación" del ADN (Doty *et al.*, 1960) e incluso demostraron que podía ocurrir entre moléculas de ADN y ARN con una sensibilidad de 1:100.000. El descubrimiento de Doty *et al.* sentó las bases para todos los métodos de hibridación utilizados actualmente con la única diferencia de que en los métodos actuales se introduce un fragmento de hebra simple, denominado "sonda", el que al estar en una concentración mayor al ADN doble hebra y producirse la renaturalización, forma un híbrido "sonda: ADN" (Alberts *et al.*, 1994).

En 1962, Arber aisló y purificó enzimas que cortaban el ADN en secuencias específicas (Watson & Tooze, 1981). Estas enzimas tenían la particularidad de reconocer secuencias palindrómicas en el genoma y cortar ambas hebras. La función de estas enzimas es proteger a las bacterias de infecciones virales degradando el ADN viral (Nathans & Smith, 1975).

La utilización de estas enzimas en el análisis de ADN permitió cortar esta gran molécula en fragmentos más pequeños y específicos y así estudiarla en regiones discretas. Posteriormente, el descubrimiento de enzimas con capacidad de unir fragmentos de ADN (ADN ligasa) dio origen a moléculas de ADN recombinante. Al combinar el corte con enzimas de restricción en dos moléculas diferentes y reunir los fragmentos generados utilizando la ADN ligasa, se crearon las primeras moléculas de ADN recombinante, dando origen a la ingeniería genética (Gilbert & Villa-Komaroff, 1980).

En 1975, Southern desarrolló un método para fijar ADN digerido por enzimas de restricción a un soporte sólido y realizar en él la hibridación con sondas específicas. Esta técnica se basa en la separación del ADN por migración electroforética a través de un polímero, usualmente agarosa, y posteriormente transferirlo y fijarlo a una membrana de nitrocelulosa. La técnica desarrollada se llamó Southern-blot y la extensión de esta metodología a ARN se denominó Northern-blot y a proteínas, Western-blot (Alberts *et al.*, 1994).

Otras variaciones de este método, que no utilizan la separación electroforética, se denominan dot-blot o slot-blot (Alberts *et al.*, 1994).

Entre 1975 y 1977 dos grupos, Sanger *et al.* y Maxam y Gilbert (Alberts *et al.*, 1994) desarrollaron métodos de secuenciación del ADN. Ambos métodos difieren en que uno permite leer el código genético rompiendo la molécula de ADN en nucleótidos específicos y el otro incorporando nucleótidos que bloquean la extensión de la síntesis de ADN. Este último método es el más utilizado actualmente, en particular, en los métodos de secuenciación automática.

En 1985, Mullis reunió algunas de las metodologías mencionadas para realizar síntesis de ADN *in vitro* en forma exponencial, denominando este

método reacción en cadena de la polimerasa, más comúnmente conocida por sus siglas en inglés: “PCR, Polymerase Chain Reaction” (Mullis, 1990). Esta metodología es considerada como una revolución dentro la biología molecular, ya que con la amplificación exponencial es posible el análisis de moléculas de ADN o ARN partiendo de mínimas cantidades de muestras.

A partir de esta metodología, se han desarrollado las técnicas mas modernas utilizadas hoy en día en el campo de la genómica y genómica funcional.

2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa

El método de PCR se basa en ciclos de amplificación exponencial de un fragmento específico de ADN. Este fragmento está determinado por secuencias introducidas en la reacción, denominadas cebadores (“primers”), a partir de los cuales la enzima ADN polimerasa realiza la síntesis exponencial.

Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión. La desnaturalización se realiza a 95 °C y la separación conseguida permite que cada hebra sirva como molde o templado para la síntesis de una nueva molécula de ADN. El tiempo de desnaturalización depende del largo del templado, y generalmente dura entre 30 segundos y 1 minuto. Debido a que al comienzo de la amplificación es necesario separar todo el ADN de la muestra analizada, inicialmente se realiza una incubación de 5 minutos a 95 °C por única vez.

Después de la desnaturalización sigue la etapa de alineamiento entre el ADN templado y los cebadores; esta etapa se basa en el principio de la renaturalización de Doty *et al.* y ocurre al llevar la reacción a 45 °C – 60 °C.

Sin embargo, dado que los cebadores están en mayor concentración que el templado, se favorecerá el alineamiento entre templado–cebador por sobre templado–templado. El ADN doble hebra formado (templado–cebador) definirá el sitio de acción de la ADN polimerasa o extensión, etapa en la cual esta enzima unirá nucleótidos libres en forma complementaria a la secuencia del templado. La extensión ocurre a 72 °C, que es la temperatura de máxima eficiencia de la enzima y el tiempo de la extensión dependerá de la distancia de

los cebadores entre sí.

En general se ha calculado que la ADN polimerasa es capaz de incorporar 60 nucleótidos por segundo a 70 °C (Innis *et al.*, 1988), por lo que un minuto es tiempo suficiente para incorporar alrededor de 1.000 pares de bases. Dado que se utilizan dos cebadores en la reacción, uno para cada hebra, y que éstos quedan a una distancia de entrecruzamiento durante la síntesis de ADN, el segmento definido será amplificado en forma exponencial. Así por ejemplo, si al momento de iniciarse la amplificación sólo hay una molécula de ADN doble hebra (2 templados), después de 30 ciclos de amplificación se habrán generado 1.097.736.000 copias del segmento flanqueado por los cebadores.

El elemento mas crítico de la amplificación por PCR es el alineamiento. Dado que este fenómeno se basa en la complementariedad entre las bases nitrogenadas del templado y del cebador, ésta es una unión alterada por varios factores, entre otros la temperatura.

La importancia de la amplificación por PCR se basa en que con esta magnitud de amplificación es posible el análisis de moléculas de ADN o ARN a partir de mínimas cantidades de muestra. Así por ejemplo, si consideramos 1 fg (10^{-9} g) de ADN, la amplificación por PCR permitirá generar alrededor de 0,1 µg (10^{-6} g) de una región específica de ADN. En la práctica, este método permite identificar secuencias presentes entre 10 y 50 copias en una muestra.

La visualización del producto amplificado requiere de otras metodologías posteriores a la amplificación. El método más utilizado es la electroforesis de agarosa; sin embargo, este es un método indirecto, porque sólo indica el tamaño del amplificado. La visualización directa requiere de métodos que "lean" la secuencia del amplificado. Entre estos métodos figuran cortes con enzimas de restricción, hibridación con sondas específicas (Southern-blot) o secuenciación del producto de PCR.

2.1.3. Clonación de proteasas cisteínicas vegetales

A la fecha son varias las proteasas cisteínicas de origen vegetal que han sido clonadas. Los últimos trabajos reportados dan cuenta de: una proteasa clonada

y expresada de *Oriza sativa* en *E. coli* (Su *et al.*, 2006), de la clonación del cDNA de una proteasa cisteínica termoestable de *Ervatamia* (Ghosh *et al.*, 2007), de una proteasa presente en hojas senescentes de *Ipomoea batatas* (Chen *et al.* 2002, 2006), de proteasas de *Trifolium repens* (Asp *et al.* 2004) y de *Zea mays* L. (Pechan *et al.* 2004). También se clonaron 2 proteasas de porotos de soja (Ling 2003) y otra de *Hordeum vulgare*, tipo catepsina B, (Martínez *et al.* 2003). A partir de frutos de *Bromelia fastuosa* se logró clonar fastuosaina (Cabral *et al.*, 2006) y en alfalfa se aisló y caracterizó el cDNA que codifica una proteasa cisteínica del tipo de la papaína (Yan *et al.*, 2007). En tanto que la única proteasa cisteínica de látex clonada, expresada y caracterizada es Asclepaina f, aislada en nuestro laboratorio a partir de *Asclepias fruticosa* (Trejo 2005).

2.2. Proteómica

El anuncio de la finalización de la secuenciación del genoma humano ha sido un hecho histórico que ha trascendido las fronteras del entorno científico. Se ha abierto una etapa que, aunque bautizada como “era postgenómica”, debe considerarse más como una continuación que como el final de la revolución genómica.

Gracias a la información aportada por los proyectos de secuenciación es hoy posible abordar de forma efectiva el estudio de la funcionalidad del genoma, y en especial el análisis de los productos codificados por los genes: las proteínas. La proteómica, ciencia que estudia las proteínas y sus interacciones en los distintos modelos vivos, es un área de investigación y desarrollo que ha evolucionado vertiginosamente en los últimos años. El interés suscitado por estos nuevos conocimientos reside en el potencial de la proteómica como generadora de una nueva revolución biotecnológica en sectores como el desarrollo de fármacos, o en la caracterización de marcadores de enfermedades, de uso en el diagnóstico médico. Además de estas importantes aplicaciones existen otras que quizás son menos conocidas, pero que tiene más impacto directo en nuestra vida cotidiana: en agricultura y control de alimentos, en

clasificación de pescados para el consumo o en el diagnóstico de las enfermedades reumáticas (www.proteored.org).

El término “proteoma” fue usado por vez primera en 1995 para describir el conjunto de PROTEÍNAS de un genOMA, una célula o un tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la “proteómica”.

Esencialmente la proteómica es el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares. El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2D-PAGE. Según esto, la proteómica comenzó en los años setenta cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la identificación de las proteínas era difícil debido a la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles para la caracterización de las mismas. En los años noventa, la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que elimina la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marca el comienzo de una nueva era. Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, el análisis funcional de proteínas y estudios de localización. Se puede hablar de dos tipos de proteómica: proteómica de expresión y proteómica del mapa celular.

2.2.1. Metodología proteómica

La proteómica es, junto a la genómica, una de las nuevas tecnologías que más interés están despertando últimamente. Básicamente la proteómica utiliza estrategias para identificar proteínas basadas en la digestión enzimática o química de las proteínas y en el análisis de los péptidos mediante espectrometría de masas.

El auge actual de la proteómica se debe a dos razones fundamentales: por

un lado, a los grandes proyectos de secuenciación de genomas que han generado una enorme cantidad de información y por otra parte, el avance en las técnicas de análisis químico de proteínas ocurridas en los últimos años.

El reciente desarrollo de las denominadas técnicas de “ionización suave” (MALDI y electrospray) abrió el camino al estudio de macromoléculas mediante espectrometría de masas. Estos métodos de ionización, en combinación con diversas técnicas de análisis, permiten hoy en día la identificación y secuenciación de proteínas con unos niveles de rapidez, sensibilidad y versatilidad sin precedentes. La aparición de herramientas que por primera vez en la historia de las biociencias permiten el análisis sistemático de los agentes fundamentales de la vida, las proteínas, hecho que ha dado lugar al desarrollo de la moderna proteómica.

La espectrometría de masas esencialmente es una alternativa muy importante de la técnica clásica de secuenciación de la porción N-terminal de la proteína, por medio del método de la degradación de Edman, sustituyéndola incluso en la química tradicional de proteínas, ya que es mucho más sensible, puede ocuparse de mezclas de proteínas y tiene un rendimiento de procesamiento muy alto.

El método de análisis de péptidos conocido como “mapeo de la masa del péptido” (“huella peptídica”) fue desarrollado inicialmente por Henzel y sus colaboradores en 1993 (Perkins *et al.*, 1999). Dicho método permite obtener el espectro total de la mezcla de péptidos provenientes de la digestión específica de la secuencia de la proteína; lo que da lugar a una huella digital de las masas de los péptidos de la proteína que está siendo estudiada. Este espectro total es obtenido por un método de espectrometría de masas relativamente simple, utilizando una fuente de ionización y la desorción de muestras asistida por un láser (MALDI-TOF), lo que resulta en una medición del “tiempo de vuelo” de los péptidos que constituyen la mezcla.

Recientes avances en la automatización del procedimiento de identificación de proteínas mediante MALDI han permitido que cientos de proteínas puedan ser obtenidas desde los geles de electroforesis, digeridas enzimáticamente y su

espectro de masas analizado automáticamente e identificado en las bases de datos de proteínas (Jensen *et al.*, 1997; Berndt *et al.* 1999). En un procedimiento de dos etapas para la identificación rápida e inequívoca de una proteína, la huella digital de la proteína obtenida mediante MALDI sería un primer paso (Shevchenko *et al.*, 1996; Shevchenko *et al.*, 2000). El segundo paso será la secuencia de péptidos individuales. En este método, los péptidos son ionizados directamente por ionización en electroaspersión a partir de la fase líquida. Los iones de los péptidos ingresan con un rocío en un espectrómetro de masas en serie que tenga la capacidad de separar los péptidos de una mezcla, además de aislar una especie al mismo tiempo y de disociarla en los fragmentos amino o carboxilo-terminal. Los datos de la secuencia no sólo se pueden utilizar para identificar proteínas en bases de datos de secuencias de aminoácidos sino también en bases de datos de secuencias de nucleótidos y bases de datos de genomas.

En definitiva, la proteómica proporciona un conjunto de herramientas muy poderosas para el estudio a gran escala de la función de los genes a nivel de proteína. Los estudios mediante espectrometría de masas de las proteínas separadas en geles está conduciendo al renacimiento de las aproximaciones bioquímicas para el estudio de la función de las proteínas. Actualmente existen dos estrategias bien definidas para el estudio del proteoma: una de ellas se basa en la utilización de la electroforesis bidimensional y la otra utiliza otros métodos de separación de proteínas, principalmente métodos cromatográficos. En ambos casos la identificación y caracterización de proteínas se realiza mediante espectrometría de masas.

3. INTRODUCCIÓN A LA BIOCATÁLISIS EN MEDIOS NO CONVENCIONALES

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances, que fueron rápidamente transmitidos a aplicaciones industriales en la obtención de productos químicos, esencialmente en las industrias alimentaria y

farmacéutica.

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos:

- a) poseen una gran actividad catalítica
- b) muestran una gran especificidad de sustrato (incluso estereoselectividad y regioespecificidad)
- c) son muy activos a temperatura ambiente y presión atmosférica.

A pesar de estas claras ventajas, el empleo de enzimas no se ha generalizado en los procesos químicos industriales debido a que la mayoría de las enzimas no son estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. Con la inmovilización de las enzimas se han podido superar estos últimos inconvenientes, permitiendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

En general, la mayoría de los procesos de catálisis enzimática son llevados a cabo en soluciones acuosas. No obstante, muchos de los productos de reacción no pueden obtenerse en medio acuoso por razones tales como:

- a) insolubilidad de sustratos
- b) equilibrio termodinámico desfavorable
- c) inhibición de la actividad enzimática debida a reactivos y/o productos
- d) dificultad para obtener los productos.

La biocatálisis en fase orgánica no sólo permite la expresión de la funcionalidad de las enzimas, sino que exhibe ventajas relevantes respecto de la biocatálisis en fase acuosa (Cesti, *et al.*, 1986), tales como:

- a) cambios en el equilibrio de la reacción, como consecuencia de la alteración del coeficiente de partición de sustratos y productos entre las fases de interés, pudiendo favorecer la reacción de síntesis y evitar la hidrólisis de péptidos, ésteres, amidas, etc.
- b) facilidad de recuperación de los productos y del biocatalizador

- c) aumento de la termoestabilidad del biocatalizador
- d) aumento de la estereoespecificidad en la resolución de mezclas racémicas

El interés por desarrollar procesos enzimáticos en fase orgánica ha crecido notablemente en las últimas décadas por cuanto representan una interesante alternativa a procesos de síntesis química convencionales (Klibanov, 1986). Además existe la posibilidad de influenciar las propiedades enzimáticas por medio de la naturaleza del solvente usado en la mezcla de reacción (Wescott & Klibanov 1994).

Básicamente existen dos tipos de sistemas de biocatálisis en solventes orgánicos: homogéneos y heterogéneos. Los sistemas homogéneos son mezclas de agua con solventes orgánicos miscibles. Los sistemas heterogéneos pueden dividirse en sistemas macroheterogéneos, entre los que se pueden distinguir sistemas de dos líquidos inmiscibles, y sistemas sólido-líquido, en donde la enzima está inmovilizada en una matriz sólida o bien en forma de proteína insoluble suspendida en el solvente orgánico, y sistemas microheterogéneos representados por micelas reversas. Estos sistemas difieren drásticamente de aquellos que han sido usados tradicionalmente, y también son diferentes entre sí (Illanes & Barberis, 1994).

Una de las estrategias para evaluar y seleccionar el sistema de reacción contempla la posibilidad de utilizar al catalizador en fase sólida, lo que permitiría mayor estabilidad del mismo en los distintos medios a ensayar (acuosos y no acuosos) y su posible reutilización, siendo esta última una de las aplicaciones más interesantes y prometedoras.

3.1. Inmovilización enzimática en distintos soportes.

La catálisis enzimática en fase heterogénea (enzimas inmovilizadas) permite un uso más eficaz del catalizador al estabilizar la estructura proteica de la enzima y asimismo permite el desarrollo de procesos continuos con todas las ventajas operacionales asociadas (Travascio *et al.*, 2002).

La inmovilización es el proceso de capturar la enzima en un espacio determinado en contacto con la solución que contiene sustratos y productos. La

inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (Gerhartz 1990).

La inmovilización de la enzima permite utilizarla en reiteradas ocasiones, disminuyendo así el costo de operación y evitando una etapa de separación del producto de la enzima, lo que encarece el proceso. En la Tabla 2 se presentan las principales ventajas y desventajas del empleo de enzimas inmovilizadas y además se compara con las ventajas y desventajas del uso de enzimas libres. (Giorno & Drioli, 2000; Ferreira *et al.*, 2002)

Tabla 2.- Ventajas y desventajas de la Inmovilización.

Enzima Soluble		Enzima Inmovilizada	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Menor costo • Utilizable en caso de sustrato con alto peso molecular • No existen pérdidas de actividad (mayor actividad específica) 	<ul style="list-style-type: none"> • Gran cantidad de enzima remanente en producto luego de participar en la reacción • No es posible el rehuso de la enzima • La reacción está limitada por Inhibición por producto • Dificultad de un preciso control • Si es necesario, detener la reacción con calor, lo que puede afectar el alimento 	<ul style="list-style-type: none"> • La enzima es reutilizable • La reacción puede terminarse por la separación del sustrato de la enzima • El control es más preciso • Hay una menor inhibición por producto • Mayor estabilidad a condiciones de T° y pH • Puede usarse en forma batch o continua • Existe una gran flexibilidad en el diseño de reactores 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja actividad específica (Pérdida de actividad en inmovilización) • Restricciones difusionales o estéricas • Inactivación con una operación continua • Mayor costo, debido al soporte y el proceso de inmovilización • Necesita sanitización o regeneración del reactor.

Los ensayos de biocatálisis en medio orgánico requieren de enzimas que deben encontrarse ya sea en estado sólido (liofilizadas o bien como polvos o precipitados acetónicos) o en forma inmovilizada. Los métodos que pueden ser empleados son el entrampamiento en geles de poliacrilamida, la inmovilización por adsorción de proteasas sobre soportes sólidos (poliamida, celite) y la inmovilización por unión covalente sobre agarosa activada, entre otros.

La inmovilización por adsorción de proteasas sobre soportes sólidos (poliamida, celite) es un método sencillo y económico y se ha aplicado para la síntesis enzimática de péptidos saborizantes (Morcelle *et al.*, 2006) y tensioactivos con propiedades antimicrobianas (Clapés & Infante, 2002).

La inmovilización de enzimas a soportes que contienen grupos aldehídos alifáticos, como por ejemplo glioxil-agarosa, presenta una serie de interesantes características desde el punto de vista práctico. Se puede aumentar la rigidez de la molécula enzimática y por lo tanto hacerlas más resistentes a cambios conformacionales inducidos por calor, solventes orgánicos y otros, comparada a las moléculas solubles. Además, el grueso de la estructura proteica no se verá afectada aún cuando se hayan establecido un gran número de enlaces (Guisán, 2006). La agarosa corresponde a un tipo de soporte utilizado para inmovilizar enzimas debido a sus buenas propiedades físico-químicas: a mayor grado de entrecruzamiento, se tiene mayor superficie, dado que las fibras que componen la agarosa son más gruesas y el tamaño del poro se hace más pequeño, por lo tanto se puede cargar este soporte con más grupos reactivos. Este tipo de soporte, debido a sus características físico-químicas, ha sido utilizado para inmovilizar mediante la técnica de unión multipuntual covalente algunas enzimas como penicilina G acilasa de *Escherichia coli* (Guisán *et al.* 1990), tripsina (Guisán *et al.* 1997) y α -quimotripsina de páncreas de bovino (Guisán *et al.* 1991). El método de inmovilización multipuntual covalente, es aquel en el que los residuos aminoacídicos de la molécula enzimática reaccionan con los residuos de un soporte activado, quedando ubicada la enzima en su superficie mediante el establecimiento de varios puntos de unión.

El entrapamiento consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El entrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El entrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el entrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína (Arroyo, 1998; Guisán, 2006).

3.2. Aplicación de proteasas a la biosíntesis en medios no convencionales.

La catálisis enzimática en fase orgánica es una alternativa interesante para llevar a cabo procesos biocatalíticos que no puedan realizarse o lo hagan con dificultad en agua (Morcelle *et al.*, 2006; Quiroga *et al.*, 2006, Quiroga *et al.* 2007, Guzmán *et al.*, 2007). Dichos métodos enzimáticos presentan ventajas tales como condiciones suaves de reacción, proceder sin racemización y con elevada estereoespecificidad (Björup *et al.* 1998), lo cual hace que dichos biocatalizadores sean especialmente atractivos para el área farmacéutica y de la agroquímica. Además, se ha demostrado que las enzimas pueden ser más estables, aunque menos activas, en solventes orgánicos, en donde es más favorable la formación de los enlaces peptídicos que la hidrólisis de péptidos (Liu *et al.* 2002).

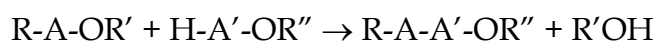
Desde un punto de vista industrial las proteasas son enzimas con características muy importantes utilizadas en la industria del cuero, de los detergentes, en la producción de hidrolizados proteicos y en la industria de los alimentos (Ghorbel *et al.* 2003). Actualmente, la aplicación de proteasas en la producción de pequeños oligopéptidos ha recibido mucha atención ya que constituye una alternativa viable a la síntesis química (Fan *et al.* 2001). La síntesis de dipéptidos y tripéptidos es importante para la industria farmacéutica y de los alimentos (Clapés *et al.* 1995; Calvet *et al.* 1996; Björup *et al.* 1999; Trusek-Holownia 2003).

En la bibliografía se ha informado el uso de fitoproteasas cisteínicas tales como papaína (Mitin *et al.* 1984), ficina (Monter *et al.* 1991) y, más recientemente, *Morrenia brachystephana* (Barberis *et al.* 2002), *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.*, 2006) y *Araujia hortorum* (Quiroga *et al.* 2007) para la síntesis de péptidos en medios no convencionales.

La síntesis de péptidos mediante endopeptidasas es una de las aplicaciones de mayor potencial de la catálisis enzimática en fase orgánica, lográndose desplazar el equilibrio de la reacción desde la hidrólisis hacia la síntesis.

Uno de los ejemplos más conocidos de la síntesis enzimática de péptidos es la síntesis del dipéptido aspartamo catalizada por termolisina inmovilizada, que en la actualidad se transformó en el líder de los edulcorantes no calóricos a nivel mundial (Oyama, 1987)

La formación de uniones peptídicas obedece a la siguiente reacción:



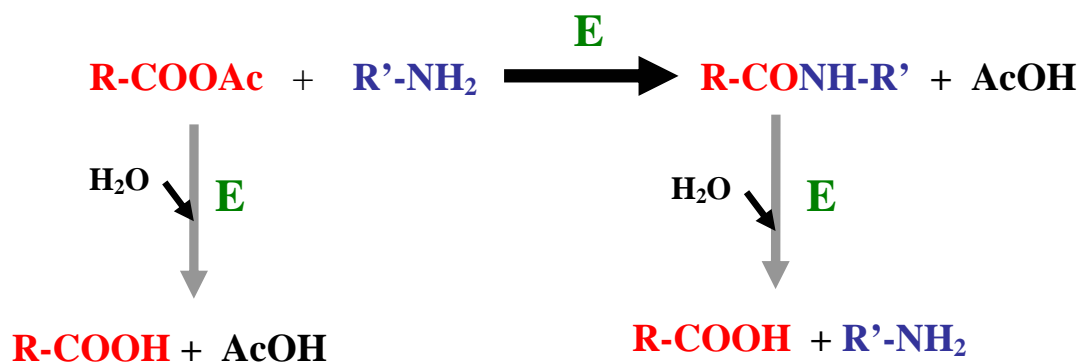
donde R, R' y R'' son los grupos protectores N-terminal y C-terminal de los sustratos, en tanto que A y A' son residuos de aminoácidos.

Los métodos de formación de uniones peptídicas catalizadas por proteasas pueden ser clasificados dentro de dos estrategias básicas, en función del tipo de componente carboxílico (donante de acilo) utilizado. Una es la inversa de la hidrólisis de péptidos (aproximación termodinámica o síntesis controlada en el equilibrio) en donde el grupo R' es un H, es decir, el componente carboxílico es un grupo carboxilo terminal libre. La otra, corresponde a la aminólisis de

aminoácidos N-protectados o derivados peptídicos (aproximación cinética o síntesis bajo control cinético) en donde el grupo R' es un éster o una amida, es decir un donante de acilo activado (Jakubke *et al.* 1985; Murakami *et al.* 2000).

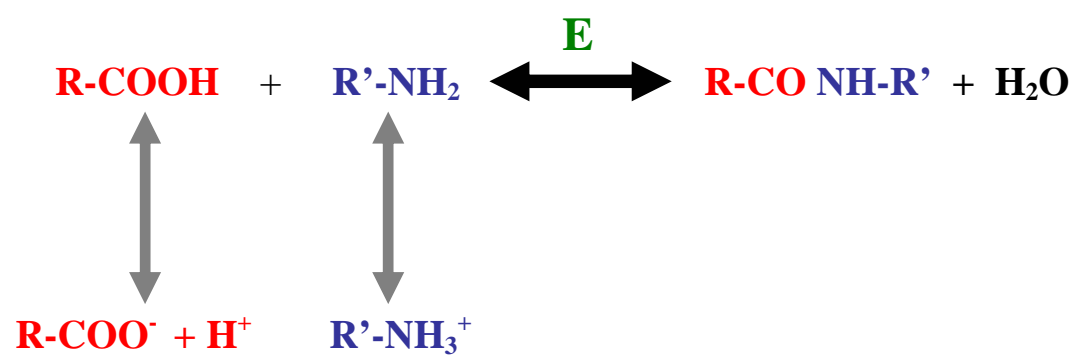
En la síntesis bajo control cinético, el intermediario acil-enzima se forma rápidamente y particiona competitivamente al reaccionar con el componente nucleofílico (aminólisis) por un lado, y el agua (hidrólisis) por otro. Sólo la aminólisis rinde el péptido deseado, mientras que la hidrólisis da origen al donante de acilo con el grupo carboxilo libre. Debido a que las proteasas no son aciltransferasas perfectas, pueden ocurrir reacciones laterales no deseadas tales como la hidrólisis del intermediario acil-enzima o la hidrólisis secundaria del dipéptido formado. Estos inconvenientes pueden ser superados por medio de ingeniería de medios (medios orgánicos) o de enzimas (Jakubke, 1987).

Control Cinético



Por su parte, en una reacción de síntesis bajo control termodinámico el equilibrio químico puede ser desplazado hacia la formación de uniones peptídicas por la adición de un medio orgánico, por extracción continua del producto de síntesis o por la formación de productos insolubles (Murakami *et al.* 2000, Bordusa, 2002).

Control Termodinámico



REFERENCIAS

- Abraham, K.I. & P.N. Joshi (1979a) Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. I. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate, *Biochim. Biophys. Acta*, **568**: 111-9.
- Abreu Payrol, J., W.D. Obregón, C.L. Natalucci & N.O. Caffini (2005) "Reinvestigation of the proteolytically active components of Bromelia pinguin fruit ". *Fitoterapia*, **76**: 540-548.
- Abreu Payrol, J., W.D. Obregón, S.A. Trejo & N.O. Caffini. (2007) "Purification and Characterization of Four New Cysteine Endopeptidases from fruits of Bromelia pinguin L. grown in Cuba". *The Protein Journal*, PMID: 17932734 .En prensa.
- Abraham, K.I. & P.N. Joshi (1979b) Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. II. Physico-chemical properties of calotropain-FI and F-II, *Biochim. Biophys. Acta*, **568**: 120-6.
- Agusti, C., K. Takeyama, L.O. Cardel, I. Ueki, J. Lausier, Y.P. Lou & J.A. Nadel (1998) Goblet cell degranulation after antigen challenge in sensitized guinea pigs. Role of Neutrophils, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **15**:1253-8.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J.D. Watson (1994) "Recombinant DNA technology" en: *Molecular Biology of the Cell* 3th Edition Garland pp: 291-334.
- Arima, K., Uchikoba, H., Yonezawa, H., M. Shimada, & M. Kaneda (2000). "Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*". *Phytochemistry*, **53**: 639-644.
- Arroyo, M. (1998) "Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones" *Ars Pharmaceutica*, **39**: 23-39.
- Asif-Ullah M., Kim K.S. & Y.G.Yu (2006) "Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburghi". *Phytochemistry*, **67**: 870-5.
- Asp, T., S. Bowra, Borg & P.B. Holm (2004) "Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and enzymatic characterisation of a cysteine protease from white clover (*Trifolium repens*)". *Biochim. Biophys. Acta*, **1699** (1-2):111-22.
- Azarkan, M., A. El Moussaoui, D. van Wuytswinkel, G. Dehon & Y. Looze (2003) "Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*". *Journal of Chromatography B*, **790**: 229-238.
- Azarkan, M., R. Dibiani, C. Baulard & D. Baeyens-Volant (2006) "Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and activity" *International Journal of Biological Macromolecule*, **38**: 216-224.
- Avery O., C. MacLeod & M. McCarty "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types". (1944). *J Exp Med.*, **79**: 137-57.
- Baltimore, D. y C. Heilman (1998) HIV vaccines: prospects and challenges, *Sci. Am.*, **279**: 78-83

- Barberis, S.E. & A. Illanes (1994) *Enzyme Biotechnology*, 1st ed., 35 th Monograph, Biology Series, The Secretariat of the Organization of American States, Washington, D.C., USA. Annex p.p. 250-253.
- Barberis, S.E., E. Quiroga, M.C. Arribére, & N. Priolo (2002) "Peptide synthesis in aqueous-organic biphasic systems catalyzed by a protease isolated from *Morrenia brachystephana* (Asclepiadaceae)". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **17**(1):39-47.
- Barragán, B.E., M.T. Cruz, L.M. del Castillo & M. Castañeda-Agulló (1985). "Proteinases of mexican plants. XI. Asclepain g from the látex of *Asclepias glaucescens*". *Rev. Latinoameri. Quím.*, **16**:117-119.
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner. (1998) "Handbook of Proteolytic Enzymes". Academic Press, London.
- Barrett, A., N. Rawlings & J. Woessner (2004) Introduction. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press.
- Bartlett, J.G. & R.D. Moore (1998) Improving HIV therapy, *Sci. Am.*, **279**: 64-73.
- Belozersky, A., Y.E Dunaevsky & N. Voskoboynikova (1990). "Isolation and properties of a metalloproteinase from buckwheat *Fagopyrum esculentum* seeds". *Biochem. J.*, **272**:677-682.
- Berndt, P., U. Hobohm & H. Langen (1999). "Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints" *Electrophoresis*, **20**: 3521-3526.
- Biswas, S., C. Chakrabarti, S. Kundu, M.V. Jagannadham & J.K. Dattagupta (2003) Proposed amino acid sequence and the 1.63 Å X-ray crystal structure of a plant cysteine protease, ervatamin B: some insights into the structural basis of its stability and substrate specificity, *Proteins*, **51**: 489-97.
- Bond, H.M. & D.J. Bowles (1983). "Characterization of soybean endopeptidase activity using exogenous and endogenous substrates". *Plant Physiol.*, **72**:345-370.
- Björup, P., E. Wehtje & P. Adlercreutz (1996) "Effects of acetonitrile-water mixtures on α -chymotrypsin catalysed dipeptide synthesis". *Biocatalysis and Biotransformation*, **13** (3):189-200.
- Björup, P., P. Adlercreutz & P. Clapés (1999) "Useful methods in enzymatic synthesis of peptides: a comparative study focusing on kinetically controlled synthesis of Ac-Phe-Leu-NH₂ catalyzed by α -chymotrypsin". *Biocatalysis and Biotransformation*, **17**(5): 319-345.
- Bordusa, F. (2002) "Proteases in organic synthesis". *Chemical Reviews*, December, **102** (12):4817-4868.
- Brockbank, W.J. & K.R. Lynn (1979) "Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed)". *Biochim. Biophys. Acta.*, **578**:113-122.
- Broglie, K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Knowlton, C. Mauvais & R. Broglie (1991). "Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*". *Science*, **254**:1194-1197.
- Brömme, D. & J. Kaleta (2002) "Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design". *Curr. Pharm. Des.*, **8**: 1639-58

- Brown, R. (1811) "On the *Asclepiadeae*, a natural order of plants separated from the *Apocynae* of Jussieu. *Mem Wernerian Nat. Hist. Soc.* **1**: 12-78. Reproducido en 1876 en *Miscellaneous Bot. Works of R. Brown* **II**: 193-247, en *Darviniana* **23** (2-3): 368.
- Bruno, M.A., M.A. Pardo, N.O. Caffini & L.M.I. López. (2003). "Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*)". *Journal of Protein Chemistry*, **22**: 127-134.
- Bruno, M.A., S.A. Trejo, X.F. Avilés, N.O. Caffini & L.M.I. López (2006). "Isolation and characterization of Hieronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez. *The Protein Journal*, **25**: 224-231.
- Bruno, M. (2007) "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de frutos *Bromelia hieronymi* Mez. (*Bromeliaceae*)" Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Cabral H., A.M., E.H. Tajara, L.J. Greene, V.M. Faça, R.P. Mateus, C.R. Ceron, A. de Souza Judice, L. Julianod, G.O. Bonilla-Rodriguez (2006). "Preliminary functional characterization, cloning and primary sequence of Fastuosain, a cysteine peptidase isolated from fruits of *Bromelia fastuosa*". *Protein Pept. Lett.*, **13**:83-9.
- Calvet, S., J.T. Torres & P. Clapés (1996) "Enzymatic peptide synthesis in organic media. Synthesis of CCK-8 dipeptide fragments" *Biocatal. Biotrans.*, **13**: 201-216.
- Camperi, S., R. Hours, R. Audaz, M. Miranda & O. Cascone "Jugos de fruta sin metanol" (1996) *Ciencia Hoy* vol. 6 N°33.
- Carpenter, D.C. & F.E. Lovelace (1943). "The isoelectric point of Asclepain". *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**:2364-2365.
- Cesti, P., F. Francalanci, & M. Foa (1986). *La Chimica e la industria*. **68**: 11-15
- Chabregas, S. (2003). "Caracterização da localização subcelular da proteína TH11 de *Arabidopsis thaliana*". Tesis doctoral. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Brasil.
- Chakrabatti, C., S. Biswas, S. Kundu, M. Sund, M.V. Jagannadham & J. K. Dattagupta (1999). "Crystallitation and premilinary X-Ray analysis of ervatamin B and C, two thiol proteases from *Ervatamia coronaria*". *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **55**:1074-1075.
- Chargaff E. (1950) "Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation". *Experientia*, **6**: 201-9.
- Chen, G.H., L.T. Huang, M.N. Yap, R.H. Lee, Y.J. Huang, M.C. Cheng & S.C. Chen (2002) "Molecular characterization of a senescence-associated gene encoding cysteine proteinase and its gene expression during leaf senescence in sweet potato". *Plant Cell Physiol.*, **43**(9):984-91.
- Chen H.J., D.J. Huang , W.C. Hou , J.S. Liu & Y.H. Lin (2006) "Molecular cloning and characterization of a granulin-containing cysteine protease SPCP3 from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves". *J. Plant Physiol.*, **163**(8):863-76.

- Cimerman, N., P.M. Brguljan, M. Krasovec, S. Suskovic & J. Kos (2001) "Circadian and concentration profile of cathepsin S in sera from healthy subjects and asthmatic patients". *Pflugers Arch.*, **442**: 204-6.
- Clapés, P., J. L. Torres & P. Aldercreutz (1995) "Enzymatic Peptide Synthesis in Low Water Content Systems: preparative Enzymatic Synthesis of [Leu]- and [Met]- Enkephalin Derivatives", *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **3**:245-255.
- Clapés, P. & M.R. Infante (2002) "Amino acid-based surfactants: enzymatic synthesis, properties and potential applications". *Biocatal. Biotrans.*, **20**: 215-233.
- Cordeiro, M., P.E. Brodelius & S.M. Pais (1998). *Cyprosin. Handbook of Proteolytic Enzymes*. (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. eds.), Academic Press, London, pp.: 839-842.
- Coussens, L.M., B. Fingleton & L.M. Matrisian (2002) "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations". *Science*, **295**: 2387-92.
- Curotto, E., G. S. González, O. Reilly & G. Tapia (1989). "Isolation and partial characterization of a protease from *Cucurbita ficifolia*". *FEBS Lett.*, **243**:363-365.
- Dahlgren, A., I. Kvarnstrom, L. Vrang, E. Hamelink, A. Hallberg, A. Rosenquist & B. Samuelsson (2003) "New inhibitors of the malaria aspartyl proteases plasmepsin I and II". *Bioorg. Med. Chem.*, **11**: 3423-37.
- Dalkin, K., S. Marcus & D.J. Bowles (1983). "Endopeptidase activity in jackbeans and its effect on concanavalin A". *Planta*, **157**:531-535.
- Doty P., J. Marmur, J. Eigner & C. Schildkraut (1960). "Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: physical chemical studies". *Proc Natl Acad Sci USA.*, **46**: 461-76.
- Dalling, M.J. (1986) *Plant proteolytic enzymes*, Vol I. CRC Press, Inc., Florida.
- Drenth, J., J.N. Jansonius, R. Koekoek, H.M. Swen & B.G Wolthers (1968). "Structure of papain". *Nature*, **218**:929-932.
- Endress, M. E. & P. Bruyns (2000) "A revised classification of Apocynaceae sl". *Bot. Rev.*, **66**: 1-56.
- Fan, K., P. Ouyang, X., Wu & Z. Lu (2001) "A model of interfacial inactivation for papain in aqueous organic biphasic systems". *Enzyme Microb. Tech.*, **28**: 3-7.
- Ferreira, L., M.A. Ramos, M.H. Gil & J.S. Dordick (2002). "Exquisite regioselectivity and increased transesterification activity of an immobilized *Bacillus subtilis* protease" *Biotechnol. Prog.*, **18**: 986-993.
- Fierro A. (2001). "Breve historia del descubrimiento de la estructura del ADN". *Rev Méd Clínica Las Condes.*, **20**: 71-75.
- Filippova I.Y., E.N. Lysogorskaya, E.S. Oksenoit, G.N. Rudenskaya & V.M. Stepanov (1984) "L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide - A chromogenic substrate for thiol proteinase assay". *Anal. Biochem.*, **143**: 293-297.
- Freifelder D M. "The DNA molecule Structure and Properties". (1978) WH Freeman, pp: 1-7.

- Freitas, C.D.T., J.S. Oliveira, M.R.A. Miranda, N.M.R. Macedo, M.P. Sales, L.A. Villas-Boas, & M.V. Ramos (2007) "Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*" *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 781-789.
- Fujinaga, M., M.M. Cherney, H. Oyama, K. Oda. & M.N. James (2004) "The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 3364-3369.
- Gerhartz, W. (1990) "Enzymes in industry. Production and applications" Ed. Síntesis, Madrid.
- Ghorbel, B., A. Sellami-Kamoun & M. Nasri (2003) "Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1" *Enzyme and Microbial Technology*, **32**(5): 513-518.
- Ghosh R, Dattagupta JK, & S.Biswas (2007) "A thermostable cysteine protease precursor from a tropical plant contains an unusual C-terminal propeptide: cDNA cloning, sequence comparison and molecular modeling studies". *Biochem Biophys Res Commun.*, **362**:965-970.
- Gilbert W. & L. Villa-Komaroff (1980). "Useful proteins from recombinant bacteria". *Sci Am.*, **242**: 74-94.
- Giorno, L. & E. Drioli, (2000). "Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives". *Trends Biotech.*, **18**: 339-349.
- Gowen, M., J.G. Mery & S. Kumar (2000) *Emerg Drugs*, **5**:1-43.
- Greenberg, D.M. & T. Winnick (1940). "Plant proteases II. pH-activity curves". *J. Biol. Chem.*, **135**:775-780.
- Grudkowska, M. & B. Zagdańska (2004). "Multifunctional role of plant cysteine proteinases". *Acta Bichimica Polonica*, **51** (3): 609-624.
- Guisán, J., A. Bastidas, C. Cuesta, R. Fernandez & M. Rosel (1990) "Immobilization-stabilization of penicillin G acylase from *E. coli*" *Appl. Biochem Biotechnol.*, **26**: 181-195.
- Guisán J., A. Bastidas, C. Cuesta, R. Fernández-Lafuente & C.M. Rosell, (1991) "Immobilization-stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels" *Biotechnol. & Bioeng.*, **38**:1144-1152.
- Guisán J., G. Penzol, P. Armasen, A. Bastidas, R. Blanco, Fernandez-Lafuente, & García-Junceda. (1997) "Immobilization of Enzymes on glyoxyl agarose Immobilization of Enzymes and Cells". Bickerstaff, G.F., ed., Humana Press Inc. Totowa, pp 277-287.
- Guisán, J.M. (2006) "Immobilization of enzymes and cells" Humana Press Inc. Totowa, pp 185-204.
- Guzmán F., S. Barberis & A. Illanes (2007) "Peptide synthesis: chemical or enzymatic" *Electronic Journal of Biotechnology*, **10**: 279-314.
- Hara, I. & H. Matsubara (1980). "Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin. V. Proteolytic activities involved in globulin degradation in ungerminated seeds". *Plant Cell Physiol.*, **21**:219-232.
- Hartley, B.S. (1960). "Proteolytic enzymes". *Ann. Rev. Biochem.*, **29**:45-72.
- Henzel, W. J., T. M., Billeci, J. T. Stultsand & S. C. Wong (1993). "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**: 5011-5015.

- Hou, W.S., W. Li, G. Keyszer., E. Weber., R. Levy, M.J. Klein, E.M. Gravallesse, S.R. Goldring & D. Bromme (2002) "Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium". *Arthritis Rheum.*, **46**: 663-74.
- Illanes, A. & S. Barberis (1994) "Catálisis enzimática en fase orgánica" en *Biotecnología de Enzimas .Monografía 35. Serie Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, DC,USA. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, p. 225-254.*
- Innis M.A, K.B Myambo, D.H. Gelfand & M.A. Brow. (1988) "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA". *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 9436-40.
- Jakubke, H. D., P. Kuhl, & A. Konnecke (1985). Basic principles of protease-catalyzed peptide bond formation. *Angewandte Chemie- International Edition in English*, **24**(2): 85-93.
- Jakubke, H.D. (1987) "Enzymatic Peptide Synthesis". In: UDENFRIEND, S. & MEIENHOFER, J. eds. *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Academic Press Inc., New York, , vol. 9, p. 103-165.
- Jensen, O.N., P., Mortensen, O. Vorm & M. Mann (1997). "Automation of matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control". *Anal. Chem.*, **69**:1706-1714.
- Jussieu, A.L. (1789) *Gen. Plant.*: 143-151. En *Darwiniana* **23**: 368.
- Kaneda, M. & N. Tominaga (1975). "Isolation and characterization of a proteinase from sarcocarp of melon fruit", *J. Biochem. (Tokyo)* **78**: 1287-1296.
- Kaneda, M., H. Yonesawa & T. Uchikoba (1995). "Improved isolation, stability and substrate specificity of cucumisin, a plant serine endopeptidase". *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **22**: 215-222.
- Kaneda, M., A. Sobue, S. Eida & N. Tominaga (1986). "Isolation and characterization of proteinases from the sarcocarp of snake-gourd fruit". *J. Biochem.*, **99**:569-577.
- Kaneda, M. & N. Tominaga, (1977). "Isolation and characterization of a proteinase from white gourd". *Phytochemistry*, **16**:345-346.
- Kaneda, M., Uchikoba, T. (1994). "Protease from the sarcocarp of *Trichosantes bracteata*". *Phytochemistry*, **35**:583-586.
- Kashyap, D R, P.K. Vohra, S. Chopra & R. Tewari (2001) "Applications of pectinases in the commercial sector: a review" *Bioresour Technol.*, **77** (3): 215-27.
- Katz, B.A., J.M. Clark, J.S. Finer-Moore, T.E. Jenkins, C.R. Johnson, M.J. Ross, C. Luong, W.R. Moore & R.M. Stroud (1998) "Design of potent selective zinc-mediated serine protease inhibitors". *Nature*, **391**: 608-12.
- Kervinen, J. (1998). Aspartic Peptidases. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London. pp.: 836-839.
- Kindt, T., E.J.M. Van Damme, J. Van Beeumen & G. Gheysen (2007) "Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea spp.*" *The FEBS Journal*, **274**: 451-462.

- Klibanov, A.M. (1986) "Enzymes that work in organic solvents" *Chem. Tech.*, **6**: 354-359.
- Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori & K. Kdino (2004). "Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex." *The Plant Journal*, **37**: 370-378.
- Kulkarni, A. & M. Rao (2007) "Biochemical characterization of an aspartic protease from *Vigna radiata*: Kinetic interactions with the classical inhibitor pepstatin implicating a tight binding mechanism" *BBA - Proteins and Proteomics*, **4** (5): 619-27.
- Kumar Dubey, V. & M.V. Jagannadham (2003) "Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*". *Phytochemistry*, **62**: 1057-71.
- Kundu, S., M. Sund & M.V. Jagannadham (2000). "Purification y Characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food Chem.*, **48**:171-179.
- Kundu, S., M. Sund & M.V. Jagannadham (2002) "Alcohol and temperature induced conformational transitions in ervatamin B: sequential unfolding of domains". *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**: 155-64.
- Lecaille, F., J. Kaleta, & D. Brömme (2002) "Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design". *Chem. Rev.*, **102**: 4459-88.
- Levicar, N., T. Strojnik, J. Kos, R.A. Dewey, G.J. Pilkington & T.T. Lah (2002) "Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion". *J. Neurooncol.*, **58**: 21-32.
- Liggieri, C, M.C. Arribére, S.A.; Trejo, F. Canals, F. Avilés & N. Priolo (2004). "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex *Asclepias curassavica* L". *The Journal Protein*, **23**:403-411.
- Liggieri, C. (2005) "Proteasas extraídas del látex de *Asclepias curassavica* L. Su caracterización y aplicación en la síntesis de péptidos" Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Ling J.Q., T. Kojima , M. Shiraiwa & H. Takahara (2003) "Cloning of two cysteine proteinase genes, CysP₁ and CysP₂, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis". *Biochim Biophys Acta*, **1627**(2-3):129-39.
- Liu, P., G. Tian, K. Lee, M., Wong & Y. Ye (2002) "Full enzymatic synthesis of a precursor of bioactive pentapeptide OGP (10-14) in organic solvents" *Tetrahedron Letters*, **43**(13): 2423-2425.
- López, L.M.I. (1995). "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae)". Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Lynn, K.R., W.J. Brockbank & N.A. Clevette, (1980). "Multiple forms of the asclepains, cysteinyl proteases from milkweed". *Biochim. Biophys. Acta*, **612**:119-125.

- Maccioni, R.B., C. Ott, I.I. Concha & J.P. Muñoz (2001) "The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology". *Eur. J. Biochem.*, **268**: 1518-27.
- Mantell, S.H., J.A. Matthews & R.A. McKee (1986) "*Principles of plant biotechnology*". Blackwell Sci. Pub., Oxford, pp. 207-212.
- Martínez M., I. Rubio-Somoza, P. Carbonero & I. Díaz (2003) "A cathepsin B-like cysteine protease gene from *Hordeum vulgare* (gene CatB) induced by GA in aleurone cells is under circadian control in leaves". *J Exp Bot.*, **54**(384):951-9.
- McKerrow, J.H (1999) "Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action". *Int. J. Parasitol.*, **29**: 833-7
- Meins, F. & P. Ahl. (1989). "Induction of chitinase and b-1, 3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabaci* and *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*". *Plant Sci.*, **61**:155-161.
- Mitin, Y.V., N.P. Zapevalova, & E.Y. Gorbunova (1984) "Peptide synthesis catalyzed by papain at alkaline pH values". *International Journal of Peptide and Protein Research*, **23** (5): 528-534.
- Monter, B., B. Herzog, P. Stehle & P. Fürst (1991) "Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst". *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **14**,(2):183-191.
- Morcelle del Valle, S. R. (2004a). "Proteasas del látex de *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlechter (*Asclepiadaceae*): "Caracterización, purificación y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Bs. As. Argentina.
- Morcelle del Valle, S., N. Caffini & N. Priolo, (2004b). "Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex". *Fitoterapia*, **75**: 480-490.
- Morcelle, S., S. Barberis, N. Priolo, N. Caffini & P. Clapés (2006) "Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **41**: 117-12.
- Mrinalini M., P.J. Vithayathil, S.M. Raju & C.S. Ramadoss (2002) "Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, f.". *Plant Science*, **163**:131-139.
- Mulligan, M.S., A.B. Lentsch, M. Huber-Lang, R.-F. Guo, V. Sarma, C.D. Wright, T.R. Ulich & P.A. Ward (2000) "Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor". *Am. J. Pathol.*, **15**:1033-9.
- Mullis K B. (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Sci Am.*, **262**: 56-61, 64-5.
- Murakami, Y., T. Yoshida, S. Hayashi & A. Hirata (2000) "Continuous enzymatic production of peptide precursor in aqueous/organic biphasic medium" *Biotechnology and Bioengineering*, July, **69**(1):57-65.
- Mutlu, A. & S. Gal, (1999). "Plant aspartic proteinases: Enzymes on the way to a function". *Physiol. Plant.*, **105**:569-576.

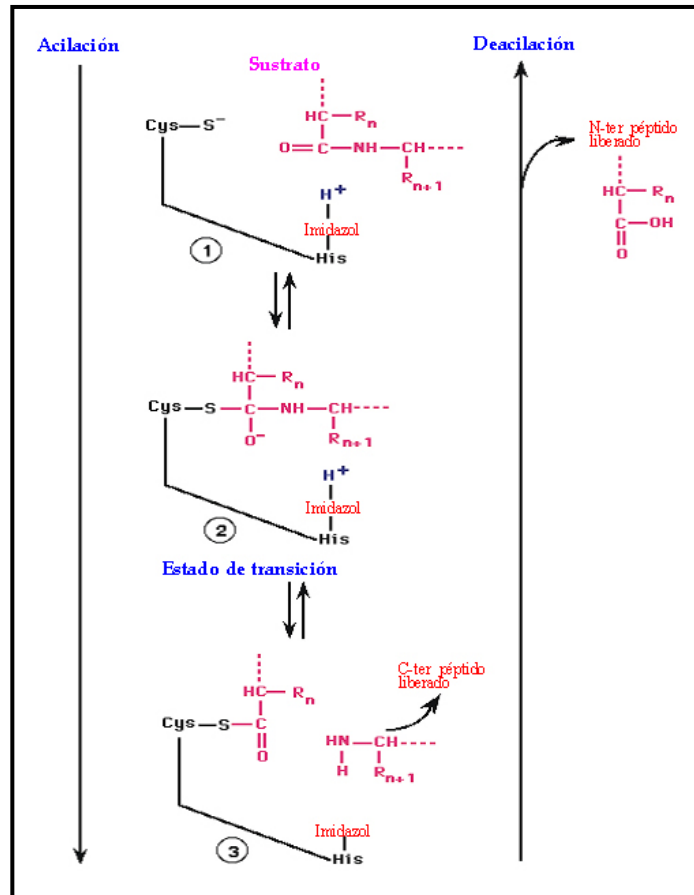
- Nallamsetty, S., S. Kundu & M.V. Jagannadham (2003) "Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*". *J. Protein Chem.*, **22**: 1-13.
- Nathans D. & H.J.O. Smith. (1975). "Restriction endo-nucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules". *Ann Rev Biochem.*, **44**: 449-67.
- NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (1984) Enzyme Nomenclature 1984, Academic Press, NY.
- Obregón, W.D., M.C., Arribére, S. Morcelle del Valle, C., Liggieri, N.O. Caffini, & N.S. Priolo (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.*, **20**:17-25.
- Obregón, W.D., R. Curciarello, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2006) "Hidrolitic Profile and isolation of the Proteolytic Components of Latex from *Araujia angustifolia* Fruits" *Acta Farm. Bonaerense*, **25**: 206-12.
- Okamoto, T., T. Shimada, I. Hara-Nishimura, M. Nishimura, & T. Minamikawa (2003). "C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase". *Plant Physiol.*, **132**:1892-900.
- Oyama, K., S. Irino & N. Hagi (1987) "Production of aspartame by immobilized thermoase" *Methods in Enzymology*, **136**:503-516.
- Pal, G. & N.K. Sinha, (1980). "Isolation, crystallization and properties of Calotropis DI and DII of *Calotropis gigantea*. *Arch Biochem. Biophys.*, **202**:321-329.
- Pande M., V.K. Dubey, S.C Yadav & M.V. Jagannadham (2006) "A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: purification and biochemical characterization" *J Agric Food Chem.*, **54**(26):10141-50.
- Pardo, M.F., L.M.I. López, N.O. Caffini & C.L. Natalucci, (2001). "Properties of a milk clotting protease isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez". *Biological Chemistry Hoppe-Seyler.*, **382**: 871-874.
- Patel B.K. & M.V. Jagannadham (2003) "A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*". *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6326-34.
- Patel A.K., V.K. Singh & M.V. Jagannadham (2007) "Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory)" *J Agric Food Chem.*, **55**:5809-18.
- Pechan T., P.W. Ma & D.S. Luthe. (2004) "Heterologous expression of maize (*Zea mays* L.) Mir1 cysteine proteinase in eukaryotic and prokaryotic expression systems". *Protein Expr Purif.*, **34**(1):134-41.
- Pereira, M.T., Lopes, M.T. P., Meira, W.I O. & C. E. Salas (2001) "Purification of a Cysteine Proteinase from *Carica candamarcensis* L. and Cloning of a Genomic Putative Fragment Coding for This Enzyme" *Protein Expression and Purification*, **22**: 249-257.

- Perkins, D. N., D. J Pappin, D. M. Creasy & J. S. Cottrell (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data". *Electrophoresis*, **20**:3551-3567.
- Pires, E. (1998a). "Cardosin A". En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London. p.: 843-844.
- Pires, E. (1998b). "Cardosin B". En: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, (Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J. ed.), Academic Press, London, pp.: 844-846.
- Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L.M.I. López, & N. Caffini, (2000). "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.*, **19**:39-49.
- Quiroga, E., N. Priolo, J. Marchese & S. Barberis (2006) "Behaviour of *araujiain*, a new cysteine phytoprotease, in organic media with low water content". *Electronic Journal of Biotechnology*, **9** (1): 18-25.
- Quiroga, E., D. Obregón, N. Priolo, J. Marchese & S. Barberis (2007) "Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (Asclepiadaceae) fruits". *Biochemical Engineering Journal*. Article in Press (doi:10.1016/j.bej.2007.08.020)
- Rajesh, R., C.D. Raghavendra Gowda, A. Natarajo, B.L. Dhananjaya, K. Kemparaju, & B.S. Vishwanath, (2005). "Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity". *Toxicon*, **46**: 84-92.
- Rao, M., A. Tanksale, M.Ghatge, & V. Deshpande, (1998). "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**(3):597-635.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barrett (1993) "Evolutionary families of peptidases". *Biochem. J.*, **290**: 205-18.
- Rawlings, N. & A. Barrett (1995). "Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism". *Methods in Enzymology*, **248**:105-120
- Rawlings, N. & A. Barrett (2004a) "Introduction the clans and families of cysteine endopeptidases". En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp.: 1051-1071.
- Rawlings, N. & A. Barrett (2004b) "Introduction: serine peptidases and their clans and families". En: *Handbook of proteolytic enzymes*, 2^{da} edn. (A. Barret, N. Rawlings & J. Woessner, eds.) Amsterdam: Elsevier Academic Press. pp.: 1417-1438.
- Rawlings, N.D., F.R. Morton & A.J. Barrett, (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D270-D272.
- Rice, K.D., R.D. Tanaka, B.A. Katz, R.P. Numerof & W.R. Moore (1998) "Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases". *Curr Pharm. Design*, **4**: 381-96.
- Riese, R.J., R.N. Mitchell, J.A. Villadangos, G.P. Shi, J.T. Palmer, E.R. Karp, G.T. De Sanctis, H.L. Ploegh & H.A. Chapman (1998) "Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity" *J. Clin. Invest.*, **101**: 2351-63.
- Roberts, S.B. (2002) "Gamma-secretase inhibitors and Alzheimer's disease". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**: 1579-88.

- Rosenthal, P.J. (1998) "Proteases of Malaria Parasites: New Targets for Chemotherapy". *Emerg. Infect. Diseases*, **4**: 49-56.
- Rudenskaya, G., E. Bogdanova, L. Revina, B. Golovkin, V., Stepanov & V.M. (1995). "Macluralisin-a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid". *Planta*, **196**:174-79.
- Rudenskaya, G.N., A.M. Bogacheva, A. Preusser, A.V. Kuznetsova, Y.E. Dunaevsky, B.N. Golovkin & V.M. Stepanov (1998). "Taraxalisin- a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb. s.l". *FEBS Let.*, **437**:237-240.
- Sajid, M. & J.H. McKerrow (2002) "Cysteine proteases of parasitic organisms". *Mol. Biochem. Parasitol.*, **120**: 1-21.
- Sanger F., S. Nicklen & A.R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**: 5463-7.
- Southern E M. (1975) "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J Mol Biol.*, **98**: 503-17.
- Schecter, I. & A. Berger, (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain", *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **27**:157-62.
- Shevchenko, A., O.N. Jensen, A.V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchenko, H. Boucherie & M. Mann (1996). "Linking genome and proteome by mass spectrometry: large scale identification of yeast proteins from two dimensional gels". *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**:14440-14445.
- Shevchenko, A., A. Loboda, A. Shevchenko, W. Ens & K. G. Standing (2000). "MALDI quadruple time-of-flight mass spectrometry: powerful tool for proteomic research". *Anal. Chem.*, **72**:2132-2141.
- Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vogeli & T. Boller. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, **324**:365-367.
- Sequeiros, C., M.J. Torres, S.A. Trejo, C. L. Natalucci & L. M. I. López (2005). "Philibertain g I the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*)". *The Protein Journal*, **24**:445-53.
- Sequeiros, C., (2006) "Búsqueda de proteasas en plantas de la Patagonia. Purificación y caracterización de endopeptidasas cisteínicas del látex de *Philibertia gilliesii* Hook et Arn. (*Apocynaceae*)" Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.
- Simões, I., R. Faro , D. Bur , & C. Faro (2007) "Characterization of recombinant CDR1, an Arabidopsis aspartic proteinase involved in disease resistance" *J Biol Chem.*, **282**: 31358-31365.
- Steppek, G., J.M. Behnke, D.J. Buttle & I.R. Duce (2004) "Natural plant cysteine proteinases asanthelmintics" *Trends Parasit.*, **20** (7): 322-327.
- Su W, Lin C, Wu J, Li K, He G, Qian X, Wei C, & J. Yang. (2006) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding Lon protease from rice (*Oryza sativa*) *Biotechnol Lett.*, **28**:923-927.
- Tablero, M., R. Arreguín, B. Arreguín, M. Soriano, R.I. Sánchez, A. Rodríguez Romero & A. Hernández-Arana (1991). "Purification and characterization of

- multiple forms of asclepain g from *Asclepias glaucescens*". *H.B.K Plant Sci.*, **74**:7-15.
- Thakurta, P.G., S. Biswas, C. Chakrabarti, M. Sundd, M.V. Jagannadham & J.K. Dattagupta (2004) "Structural basis of the unusual stability and substrate specificity of ervatamin C, a plant cysteine protease from *Ervatamia coronaria*". *Biochemistry*, **43**:1532-40.
- Travascio, P., Zito, E. Portaccio, M., Diano, N., Grano, V., Di Martino, S., Bertolini, T., Rossi, S. & D.G. Mita, (2002). "Enzyme reaction engineering: effect of metanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized Penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions". *Biotechnol. Prog.*, **18**: 975-985.
- Trejo, S.A. (2005) "Purificación, caracterización bioquímica y estructural y expresión de una endopeptidasa cisteínica de látex de *Asclepios fruticosa* L. (*Apocynaceae*)", Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Trusek-Holownia, A. (2003) "Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin" *Journal of Biotechnology*, **102** (2):153-163.
- Turk, D. & G. Guncar (2003) "Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets". *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*, **59**, 203-13.
- Uchikoba, T., H. Yonezawa & M. Kaneda (1995). "Cleavage specificity of cucumisin, a plant serine protease". *J. Biochem.*, **117**: 1126-1130.
- Uchikoba, T., H. Yonezawa, M. Shimada & M. Kaneda (1999) "Melain G, a cysteine protease from green fruits of the bead tree, *Melia azedarach*: a protease affected by specific amino acids at P₃ position". *BBA.*, **1430**: 84-94.
- Uchikoba, T., S. Hosoyamada, M. Onjyo, K. Arma, H. Yonezawa & M. Kaneda, (2001). "A serine endopeptidase from the fruits of *Melothria japonica* (thumb) Maxim". *Phytochemistry*, **57**:1-5.
- Uhlir, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. Nueva York: Willey & Sons, pp.: 1-11, 146-179.
- Vairo Cavalli, S., M.C. Arribére, A. Cortadi, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2003). "Morrenain b I, a papain-like endo-peptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)". *J. Protein. Chem.*, **22**:15-22.
- Vairo Cavalli, S.E. (2005). "Aspartilendopeptidasas de *Silybum marianum* (L.). Gaertn. con potencial aplicación en la industria láctea. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.
- Vairo Cavalli, S.E., A. Cortadi, M.C. Arribére, P. Conforti, N.O. Caffini & N.S. Priolo, (2001). "Comparison of two cysteine endopeptidasas from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)". *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **382**:879-883.
- Watson J.D. & F.H.C. Crick (1953) "A structure for Deo-xiribose Nucleic Acid". *Nature*, **171**:737-8.
- Watson J.D. & J. Tooze (1981). "The DNA story: A documentary history of gene cloning". New York: WH Freeman.
- Wescott, C.R. & A.M. Klibanov (1994) "The solvent dependence of enzyme specificity" *Biochim. Biophys. Acta*, **1206**: 1-9.

- Winnick, T., A.R. Davis & D.M. Greenberg (1940). "Physicochemical properties of the proteolytic enzyme from the latex of the milkweed, *Asclepias speciosa* Torr. Some comparisons with other proteases". *J. Gen. Physiol.*, **23**:275-288.
- Yadav, S.C., M. Pande & M.V. Jagannadam (2006) "Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*" *Phytochemistry*, **67**(14):1414-26.
- Yamashita, D.S. & R.A. Dodds (2000) "Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K". *Curr Pharm Des.*, **6**: 1-24.
- Yan, L., J.Han, Q.Yang, Y.Sun, J.Kang, Z. Liu & M. Wu (2007) "Isolation and characterization of a cDNA encoding a papain-like cysteine protease from alfalfa. DNA Seq. Sep 25;:1 [Epub ahead of print].



MATERIALES & MÉTODOS

Purificación & Caracterización de Proteasas

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS

1. MATERIAL VEGETAL

1.1. *Araujia angustifolia* (Hook. et Arn.) Decaisne.



Los frutos fueron obtenidos de plantas crecidas en la localidad de M. B. Gonnet, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La planta es una enredadera con hojas angostas, triangulares o lanceoladas, hastadas o sagitadas, con diminutas glándulas en la base y ápice del pecíolo. Presenta inflorescencias generalmente bifloras o de flores solitarias pubescentes, grandes, blanco-amarillentas.

Cáliz glanduloso, de lacinias ovadas agudas finamente pubescentes en ambas caras. Corola blanca pubérula en la superficie externa de tubo campanulado y lóbulos reflejos.

Corona de lóbulos anchos y carnosos de bordes algo lobulado, barbados en la cara interna. Ginostegio sésil. Anteras cartilaginosas subromboidales con membrana apical triangular, retináculo elipsoide con membrana apical oblonga de color café, caudículas descendentes, polineos ovoides. Apéndice estigmático totalmente exerto, grueso, subovoide, de superficie suavemente rugosa partido en el ápice. Folículos fusiformes acuminados con pubérulos, lisos. Semillas de contorno ovado oblongo, verruculosas (Burkart, 1979).

1.2. *Araujia hortorum* Fourn.



Los frutos fueron obtenidos de plantas crecidas en la localidad de Ringuelet, Provincia de Buenos Aires, Argentina. La planta es una enredadera con hojas ovado triangulares, pecioladas, obtusas en la base, enteras, discolores, glabras en el haz y albo-tomentosas en el envés, de 4-9 cm de longitud. Flores de corola color blanco o rosado de 15 mm de largo, retináculo con apéndice membranáceo en

la parte superior, tubo de la corona soldado a la corola. Los frutos, son folículos ovoideos de 14 cm de longitud, verdes, lisos y glabros (Dimitri, 1972).

Ambas especies son autóctonas y se las conoce con los nombres vulgares de “tasi” o “doca”. Ejemplares de estas especies se encuentran depositados en el herbario de Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina (LPE).

2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

2.1. Obtención de las preparaciones enzimáticas

El látex de las dos especies estudiadas se obtuvo practicando incisiones superficiales en los frutos objetos de estudio y fue colectado de dos maneras, resultando dos suspensiones:

- 1) en buffer cítrico-citrato 50 mM de pH 4,5
- 2) en buffer cítrico-fosfato 0,1 M de pH 6,4

En ambos casos con el agregado de EDTA y cisteína 5mM. El EDTA es necesario para impedir la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo (Anderson, 1968) y la cisteína para mantener el medio reductor, evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas. Los valores de pH utilizados son lo suficientemente alejados del pH óptimo a fin de minimizar la autodigestión durante los procesos de extracción enzimática.

La suspensión 1) fue centrifugada diferencialmente a 8.000 rpm durante 30 min y a 13.000 rpm por espacio de 45 min a 4°C en una centrífuga refrigerada.

La suspensión 2) fue centrifugada diferencialmente a 5.000 rpm durante 30 min a 4°C y luego ultracentrifugada a 65.000 rpm en una ultracentrífuga.

Los sobrenadantes resultantes, conteniendo las proteínas de interés, fueron denominados "*extractos crudos*" (EC). Los mismos se fraccionaron y conservaron a -20°C o se liofilizaron hasta el momento de ser utilizados en estudios posteriores.

En ambos casos se obtuvo una preparación clarificada libre de gomas y materiales vegetales insolubles presentes en el látex que pudieran interferir en el posterior estudio enzimático.

2.2. Determinación del contenido de proteínas

2.2.1. Método de Bradford

Para determinar la concentración de proteínas de los extractos crudos se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método es aconsejado para

extractos vegetales que suelen contener sustancias fenólicas, permitiendo la valoración de proteínas sin que esas sustancias interfieran, tal como sucede cuando se utiliza el clásico método de Lowry (Peterson, 1979), donde estos compuestos fenólicos modifican los valores de absorbancia).

El mecanismo implica la unión del colorante Coomassie brilliant blue G-250 a las proteínas, unión que produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína), por lo que las lecturas se realizan a esta última longitud de onda. Se utiliza albúmina bovina como proteína patrón.

2.2.1.1. Ensayo estándar

Se mezclaron 50 µl de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 min se leyó la absorbancia a 595 nm. El rango de detección de proteína de este método es de 100-1000 µg de proteína/ml.

2.2.1.2. Microensayo

Se mezclaron 250 µl de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. El rango de detección de proteína de este método es de 10-100 µg de proteína/ml.

Tanto los ensayos con las muestras problema como los respectivos blancos de reactivos se realizaron por triplicado. Para las curvas de calibración se utilizó seroalbúmina bovina (Sigma Chemical Co) en el rango de 0,1 a 1 mg/ml para el ensayo estándar y entre 5 y 100 µg/ml para el microensayo.

2.2.2. Medida de la absorbancia directa a 280 nm

El contenido de proteínas en los eluatos de las cromatografías realizadas fue estimado por medida de la absorbancia a 280 nm.

2.2.3. Método de Biuret

Este método permite verificar la presencia y cantidad de proteínas o péptidos utilizando Cu^{++} en medio alcalino produciendo una coloración

violácea por formación de un complejo de coordinación entre el Cu^{++} y los pares electrónicos libres de los nitrógenos de los grupos imino de la unión peptídica. Son necesarias por lo menos dos uniones peptídicas para que tenga lugar la reacción. Dado que la reacción del biuret no es una específica para proteínas, un resultado positivo con este reactivo debe ser cuidadosamente evaluado para descartar los resultados falsos positivos.

El blanco de reacción se realizó utilizando agua en lugar de solución enzimática. Se mezclaron 0,5 ml de solución enzimática con 10 gotas de HONa 10% más una gota de SO_4Cu_2 al 1% en un tubo de ensayo

2.3. Ensayos de actividad hidrolítica

2.3.1. Actividad esterolítica

La actividad endoesterolítica se determinó utilizando los derivados N- α -carbобензохи-*p*-nitro fenil ésteres de aminoácidos (N-CBZ-aa, Sigma Chem. Co.). Estos sustratos se utilizan debido a que tienen bloqueados tanto el grupo $\alpha\text{-NH}_2$ como el $\alpha\text{-COOH}$ del resto aminoacídico (en el último caso con un grupo cromóforo), lo que permite determinar la actividad endoesterásica relativa respecto al aminoácido que aporta el grupo carboxilo (Silverstein, 1974). La actividad de las preparaciones enzimáticas fue ensayada sobre los derivados de los siguientes aminoácidos: L-alanina, ácido L-aspartico, L-prolina, L-glutamina, L-isoleucina, L-asparagina, L-fenilalanina, glicina, L-leucina, L-lisina, L-tirosina, L-triptófano y L-valina. La mezcla de reacción contiene 1,8 ml de buffer Tris HCl 0,1 M de pH 8,0, 0,1 ml de solución de sustrato 1 mM en acetonitrilo y 0,1 ml del extracto crudo correspondiente. La reacción fue llevada a cabo a 37 °C. La absorbancia del *p*-nitrofenolato liberado por las enzimas fue monitoreada en un espectrofotómetro Agilent 8453 E UV-visible a 405 nm durante 2 minutos en intervalos de cinco segundos. En cada caso la hidrólisis no enzimática correspondiente a cada uno de los sustratos se determinó reemplazando la solución de enzima por 0,1 ml del buffer. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

La unidad enzimática (Ucbz) fue definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de *p*-nitrofenolato por minuto a 37°C y pH 8,0. Para calcular los micromoles de *p*-nitrofenolato producidos en la reacción se confeccionó una curva patrón utilizando este reactivo en el rango de 5 a 50 µM.

2.3.2. Actividad amidásica

Se utilizó L-pirotglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) 4 mM como sustrato, en buffer fosfatos 0,1M de pH 6,5, conteniendo KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM. Los ensayos se llevaron a cabo a 37 °C. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: a 180 µl de sustrato se le adicionó 1,5 ml de buffer, se homogeneizó, se agregaron 120 µl de enzima y se mezcló por inversión de la cubeta. Posteriormente se leyó la absorbancia a 410 nm en forma continua cada 5 segundos durante 2 minutos (Filippova *et al.*, 1984, Morcelle *et al.*, 2004). El blanco de reacción se realizó de la misma manera, pero agregando buffer en lugar de enzima. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La actividad enzimática se expresó en unidades PFLNA, definidas como la cantidad de enzima que libera un micromol de *p*-nitroanilina por minuto en las condiciones del ensayo.

2.3.3. Actividad pectinmetilesterasa

El fundamento de esta reacción se basa en la capacidad de gelificar que tiene la pectina en presencia de Cl₂Ca luego de ser sometida a una hidrólisis enzimática de los estéres métilicos de los ácidos glucurónicos. El Ca⁺⁺ forma puentes iónicos con los grupos carboxilatos libres de los ácidos glucurónicos y se forma el gel.

Se usó pectina al 1% en buffer cítrico fosfato 55mM de pH 6,8 conteniendo CaCl₂ 0,02M. La mezcla de reacción consistió en 600 µl de esta suspensión y 300 µl de extracto crudo, que se incubó a 37°C hasta aparición del gel. Los resultados se informan como actividad detectable (+) o no detectable (-) (Highley, 1997).

2.3.4. Actividades carboximetilcelulasa, poligalacturonidas y xilanas

Para verificar la existencia de estas actividades enzimáticas (Highley, 1997) se utilizaron los siguientes sustratos: carboximetilcelulosa al 1%, ácido poligalacturónico al 1% y xilano al 1%, en buffer cítrico fosfato 0,1 M, pH 5. Se dejó reaccionar 1 hora a 37°C. Los productos liberados, azúcares reductores, se evaluaron siguiendo el método de Somogy Nelson (Nelson, 1944; Somogy, 1952).

2.3.5. Actividad ramnogalacturonidasa

Para medir esta actividad se utilizó como sustrato ácido ramnogalacturónico al 0,5% en buffer acético-acetato 50 mM, pH 4,5. El ensayo se realizó en placas de Petri conteniendo el sustrato gelificado sobre el cual se deposita la muestra a ensayar. Se incubó 4 h a 37°C y la actividad enzimática se detecta como un halo blanco sobre la superficie del gel por el agregado de rojo de rutenio el que se une al sustrato no hidrolizado (Highley, 1997).

2.3.6. Actividad peptidásica

Los ensayos de actividad proteolítica fueron realizados utilizando caseína tipo Hammarsten (Research Organics, Cleveland, OH) como sustrato. Las soluciones para los ensayos de actividad caseinolítica se prepararon como se indica a continuación:

Solución de caseína al 1 % (p/V): se dispersa 1g de caseína en un Erlenmeyer en 80 ml de solución buffer Tris 0,05 M, pH 8,0. Se coloca el recipiente en baño de María con agua hirviendo por 20 minutos, con agitación ocasional, hasta disolución completa de la caseína. Se filtra y se deja enfriar. Se adicionan 88 mg de L cisteína (5 mM) y 186 mg de EDTA 5 mM). Se ajusta el pH con solución de hidróxido de sodio 1 M para alcalinizar, o con solución de ácido clorhídrico 6 M para acidificar. Se transfiere a un matraz aforado de 100 ml y se completa el volumen con solución buffer Tris 5 M, pH 8,0.

Solución de ácido tricloroacético 5 % (p/V): se colocan 5 ml de solución acuosa saturada de ácido tricloroacético (TCA) 100 % en un vaso de precipitado de 50 ml. Se añaden aproximadamente 30 ml de agua destilada y se homogeniza. Se transfiere a un matraz aforado de 100 ml y se completa el volumen con agua destilada.

Ensayo de actividad caseinolítica: se mezclan 100 µl de solución enzimática y 1,1 ml del sustrato de caseína al 1 % en un tubo de ensayo colocado en un baño termostatzado a 37 °C. La reacción se corta por el agregado de 1,8 ml de TCA al 5 %, los tubos se conservan en frío 30 minutos para lograr una mejor precipitación del sustrato no hidrolizado. Luego son centrifugados a 5.000 rpm durante 20 minutos y se mide la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm (A₂₈₀). Cada ensayo se realizó por quintuplicado.

Para cada experimento se preparó el correspondiente blanco, mezclando 0,1 ml de solución enzimática, 1,8 ml de TCA al 5 % y 1,1 ml caseína al 1 %, en ese orden. De esta manera se asegura la inhibición de la enzima antes del agregado del sustrato. Los blancos se realizaron por triplicado.

Cálculo de la actividad caseinolítica: La actividad proteolítica se determinó según la ecuación:

$$Ucas = \frac{A_{280}}{t \times V} \times Fd$$

donde Ucas (unidad de actividad caseinolítica) se define como la variación en unidades de absorbancia que produce 1 ml de solución enzimática, debido a los productos de digestión de la caseína solubles en ácido tricloroacético al 5 % (m/V), por minuto, a 37 °C en el buffer de reacción al pH indicado (Priolo *et al.*, 1991).

t = tiempo de duración del ensayo de actividad en minutos.

V = volumen de la solución enzimática ensayada en ml.

Fd = factor de dilución de la solución enzimática.

2.3.7. Actividad carboxipeptidásica

Para el ensayo de actividad carboxipeptidásica se añadieron 25 µl de EC en una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico conteniendo 2 ml de buffer de reacción (Tris-HCl 0,05 M con NaCl 0,1 M de pH 7,5) y 10 µl de solución de sustrato 10 mM [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja] disuelto en DMSO. La actividad fue registrada por el descenso de la absorbancia a 350 nm. Se utilizó como control positivo carboxipeptidasa A bovina (Sigma) y en el blanco se reemplazó el EC por buffer (Trejo, 2005).

2.3.7.1. Actividad inhibitoria de carboxipeptidasa a (CPA)

Para este ensayo se utilizó el protocolo descrito en el paso anterior. La actividad inhibitoria del extracto ensayado se manifiesta por una disminución en la velocidad de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción, que se corresponde con una disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato. Cabe mencionar que el EC empleado en este ensayo fue previamente inhibido (ECi) con ácido iodoacético para evitar que la proteasa cisteínica presente en el mismo degrade a la CPA y por ello disminuya su actividad

Se siguieron dos procedimientos diferentes para poner en evidencia la inhibición:

- *Sin preincubación del extracto y la enzima*

Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5 2000 µl

Solución de CPA bovina (Sigma) 10 µg/ml 7 µl

Solución de sustrato 10 mM 10 µl

Luego de 40 s de iniciada la reacción se agrega la muestra (ECi) 50 µl

- *Con preincubación del extracto y la enzima*

Muestra (EPPi) 50 µl

Solución de CPA bovina (Sigma) 10 µg/ml 7 µl

Incubar durante 6 min a 37 °C

Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M pH 7,5 2000 µl

Solución de sustrato 10 mM 10 µl

En ambos casos la reacción fue monitoreada por medidas continuas de absorbancia durante 6 min. En los blancos el EC fue reemplazado por buffer (Trejo, 2005).

2.4. Caracterización de los extractos crudos (EC)

2.4.1. Perfil de pH de la actividad proteolítica

El efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto crudo fue evaluada utilizando caseína como sustrato (rango de pH entre 6,4 y 10, 5) disuelta en buffers de Good de concentración 10 mM (Good & Izawa, 1972).

La naturaleza de los buffers de Good los hace particularmente convenientes para aplicaciones biológicas debido a que su capacidad reguladora es independiente de la temperatura y la concentración. Esto asegura que en el experimento observamos esencialmente las variaciones causadas por los cambios de pH.

Se preparó un buffer de Good stock 50 mM mezclando las siguientes cantidades:

1,3265 g de TAPS (M = 265,3).

1,2462 g de AMPSO (M = 249,3).

1,156 g de MOPS (M = 231,2).

1,1065 g de CAPS disuelto en la menor cantidad posible de NaOH 0,1 M

1,0860 g de MES (217,2).

Agua destilada, c.s.p. 100 mL.

Se preparó el sustrato de caseína al 1 % en buffer de Good a pH; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 y 11,0.

2.4.2. Efecto de inhibidores

La acción de inhibidores de cisteín proteasas (Salvesen & Nagase, 2001) fue evaluada incubando el extracto crudo durante 15 y 30 min a 37 °C con iodoacetato de sodio 50 mM y E-64 15µM y también con HgCl₂ (inhibidor reversible) durante 10 y 30 min a 45°C. La actividad caseinolítica residual

después de cada tiempo de incubación fue medida utilizando caseína como sustrato según lo indicado anteriormente.

Las preparaciones enzimáticas para el ensayo se elaboraron agregando al extracto crudo agua destilada y soluciones stock de los inhibidores en las proporciones adecuadas a la concentración de enzima:

Enzima (aproximada, suponiendo su masa molecular 25 kD): 0,025 μ M.

E- 64: 0; 0,455 μ M; 1,364 μ M y 2,273 μ M.

Ácido iodoacético: 0; 0,455 mM; 1,364 mM y 2,273 mM.

Cloruro de mercurio: 0; 0,1 mM; 0,2 mM y 0,4 mM.

Se incubaron durante 30 min a 20 °C. La actividad caseinolítica residual se determinó a la solución incubada de enzima e inhibidor con el agregado de Cys 14 mM.

2.4.3. Efecto térmico o calor de inactivación

Las curvas de progreso de la reacción para diferentes temperaturas (37 °C, 45 °C, 50 °C, and 60 °C) fueron hechas midiendo la actividad caseinolítica del extracto crudo a 5, 10, 15, 20 y 30 min para cada una de las temperaturas indicadas (Dixon & Webb, 1979).

2.4.4. Estabilidad térmica

Para determinar el efecto de la temperatura las muestras fueron mantenidas por 0, 5, 10, 15, 20, y 30 minutos a 37, 45, 50, y 60 °C y luego se midió la actividad caseinolítica residual como se mencionó anteriormente.

La preparación enzimática para el ensayo se elaboró tomando 5 ml de EC en un matraz aforado de 25 mL y enrasando con solución buffer Tris 0,05 mol/L, pH 8,5.

Se tomaron alícuotas de 100 μ L y se incuban durante 0, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos a 25, 37, 45, 55, 65 y 75 °C. Finalizado el período de incubación, las muestras se colocaron en un baño de hielo hasta medir la actividad caseinolítica residual. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado y el ensayo repitió dos veces.

2.5. Análisis Electroforético

2.5.1. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

2.5.1.1. Tipos de SDS PAGE utilizados

2.5.1.1.1. Electroforesis con Tris-glicina

Esta técnica es la clásica electroforesis discontinua, desnaturalizante y reductora de Laemmli (1970), conocida como SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Se usaron geles de poliacrilamida 12,5 % m/v. La corriente se mantuvo constante en 40 mA durante el stacking y luego se incrementó a 60 mA, manteniéndose constante durante 40 min.

Preparación de las muestras

En un primer paso las muestras se concentraron por precipitación con tres volúmenes de acetona fría (-20 °C), redisolviendo los precipitados en un volumen de buffer de muestra, de modo de obtener una concentración final de proteínas de 1-10 µg/µl. En el caso de muestras con actividad enzimática se agregó ácido iodoacético 5 mM para evitar su autodegradación. Para ello se tomaron 250 µl de muestra y se las incubó con 25 µl de iodoacetato de sodio 50mM en baño de hielo durante 30 min.

Buffer de muestra	
Tris	1,57 g
SDS	2 g
Mercaptoetanol	5 ml
Glicerol	8 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 M	
Agua destilada c.s.p.	100 ml

En un segundo paso, las muestras fueron llevadas a ebullición durante 5 min y centrifugadas a 16.000 g. Los sobrenadantes obtenidos constituyen las muestras a sembrar.

Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad. La composición de los sistemas buffer y de los geles se indican a continuación.

Buffer de resolución	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 8,8
AD, c.s.p.	100 ml

Buffer de stacking	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 6,8
AD, c.s.p.	100 ml

Gel de resolución (12,5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml
Buffer de resolución	1,25 ml
SDS 10%	100 µl
AD	4,39 ml
Persulfato de amonio (PSA) 5%	105 µl
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	5 µl
Volumen final	10 ml

Gel de stacking (5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer de stacking	0,87 ml
SDS 10%	70 µl
AD	4,79 ml
PSA 5%	105 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	7 ml

En primer lugar se colocaron 5 ml de la mezcla del gel de resolución en cada placa y se dejaron polimerizar sin mover el formador de geles. Sobre la mezcla del gel de resolución se colocaron 100 µl de n-butanol para alinear la interfase en contacto con el aire y facilitar la visualización de la polimerización. Luego de la polimerización se retiró el alcohol, se lavó la superficie con agua y se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. A continuación se colocó la mezcla del gel de apilamiento y de inmediato los peines.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton de 25 µl de capacidad. Los volúmenes de siembra fueron de 5 µl para los patrones de peso molecular. En el caso de las muestras, se calculó el volumen necesario para sembrar entre 10 y 20 µg de proteína por calle (volumen máximo 20 µl). Los patrones de PM (Bio-Rad) utilizados fueron: fosforilasa b (97,4 kD), seroalbúmina (66,2 kD), ovalbúmina (45 kD), anhidrasa carbónica (31 kD), inhibidor de tripsina (21,5 kD) y lisozima (14,4 kD).

Los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III, Bio-Rad se llenaron con buffer de reservorio.

Buffer de reservorio	
Tris	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
AD, c.s.p.	1000 ml

La electroforesis se desarrolló empleando una intensidad constante de 30 mA durante el apilado y de 60 mA hasta la finalización de la corrida (llegada del colorante al borde inferior del gel).

2.5.1.1.2. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina

Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kD, fue utilizado en primera instancia por Shägger & von Jagow (1987) y tiene la particularidad de usar dos buffers distintos. Un buffer catódico de tricina y un buffer anódico de Tris-HCl. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (Laemmli, 1970). Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kD, con un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T y 3% C) y un gel de resolución (16,5% T y 6% C). En algunos casos se utilizó un gel espaciador (10%T, 3%C).

Otra ventaja de este sistema, si se lo desea emplear como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina previene interferencias que ocurrirían en el curso del mencionado procedimiento.

Se usaron marcadores de peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio Rad) para estimar los pesos de los diferentes componentes.

Preparación de las muestras

Los precipitados acetónicos se redisolviaron en buffer de muestra para electroforesis. Se llevaron a ebullición durante 5 min y se centrifugaron durante 10 min a 9.000 rpm.

Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad. La composición de los buffers y de los geles se indican a continuación:

Buffer del gel	
Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,45
AD, c.s.p.	100 ml

Reactivos	Gel de Stacking (4% T, 3% C)	Gel Espaciador	Gel de Resolución
		(10% T, 3% C)	(16,5% T, 6% C)
Acril-Bis (48:1,5)	0,4 ml	2 ml	
Acril-Bis (46,5:3)			3,3 ml
Buffer del gel	1,25 ml	3,3 ml	3,3 ml
AD	3,4 ml	4,7 ml	3,4 ml
PSA 10%	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron como se indicó anteriormente.

En los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III, Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Buffer anódico	
Tris	24,2 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,9
AD, c.s.p	1000 ml

Buffer catódico	
Tris	12,1 g
Tricina	17,9 g
SDS	1 g
AD, c.s.p	1000 ml

Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V) durante el apilado, aumentando progresivamente el voltaje cada 10 s al ingresar las proteínas al gel espaciador hasta llegar a 100 V, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

2.5.1.1.3. Electroforesis en gradiente de poliacrilamida

Los gradientes de poliacrilamida (Hames, 1996) se obtuvieron mezclando cantidades iguales (2,2 ml) de las dos soluciones de poliacrilamida que definen los extremos del gradiente, utilizando para ello un formador de gradientes (modelo 385, Bio-Rad) colocado sobre un agitador y adosado al mismo una bomba peristáltica (modelo P-1, GE HealthCare, Biosciences). En los geles resultantes la concentración de poliacrilamida se incrementa en forma lineal desde la zona de siembra hacia el fondo de la placa.

Preparación de los geles

Las soluciones de poliacrilamida utilizadas para la obtención de los geles en gradiente se prepararon de acuerdo a las fórmulas que se indican a

continuación (las cantidades consignadas son las necesarias para preparar dos placas). El buffer de resolución empleado para preparar el gel fue Tris-HCl 3 M de pH 8,8.

Solución A	
Sacarosa	0,9 g
Buffer de resolución	0,75 ml
AD	1 ml

Gel de resolución	5%	20%
Acril-Bis (30:0,8)	1 ml	4 ml
Buffer de resolución	0,75 ml	-----
Solución A	-----	2 ml
AD	4,25 ml	-----
Tomar 2,7 ml y agregar:		
TEMED	5 µl	5 µl
PSA al 5%	12 µl	12 µl

Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 80 min a corriente constante (40 mA), empleando como buffer de reservorio buffer Tris 0,05 M - glicina 0,384 M con SDS 1% (Hashimoto *et al.*, 1983) de pH 8,5.

2.5.1.2. Fijación y Tinción

2.5.1.2.1 Tinción con Coomassie brilliant blue R-250

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados y teñidos por inmersión en solución colorante durante 2 h. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con solución decolorante para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

Solución colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
Coomassie brilliant blue R-250	100 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	34 ml
AD, c.s.p.	100 ml

2.5.1.2.2 Tinción con Coomassie coloidal

La tinción de proteínas por éste método (Neuhoff *et. al.*, 1988) provee niveles de detección en el orden de los ng (permite detectar al cabo de una hora cantidades menores a 100 ng de seroalbúmina bovina). Las condiciones del medio en el que se encuentra el colorante (alta concentración salina en un medio acuoso-metanólico) le confiere un carácter coloidal que reduce en gran medida la coloración inespecífica de fondo (background) debido a un efecto hidrofóbico que al mismo tiempo hace aumentar su afinidad por las proteínas fijadas en el gel.

Solución colorante	
Sulfato de amonio	17 gr
Acido acético glacial	500 µl
Metanol	34 ml
Coomassie brilliant blue G-250	0,1 g
AD, c.s.p.	100 ml

2.5.1.2.3 Tinción con plata

En los casos en que fue necesario se coloreó mediante la tinción de plata, que alcanza una sensibilidad hasta 100 veces mayor que la tinción de Coomassie brilliant blue R-250 (Hames, 1996).

Para realizar esta coloración se siguió el método de O'Connell y Stults (1997), basado en la unión de los iones plata a las proteínas y su posterior reducción; la propiedad del tiosulfato de formar complejos solubles de plata permite eliminar luego el background producido por precipitación de sales insolubles.

Fijación

Las proteínas fueron fijadas por inmersión de los geles en solución fijadora durante 30 min, repitiendo la operación 3 veces; este procedimiento previene la difusión de las proteínas y remueve sustancias interferentes.

Solución fijadora	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	30 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Lavado y sensibilización de los geles

Luego de la fijación, los geles fueron lavados con etanol al 20% (10 min) y luego con AD (10 min) para eliminar el ácido acético, cuya acidez interfiere en la siguiente etapa. Posteriormente, y con el fin de sensibilizarlos, fueron sumergidos en una solución de tiosulfato de sodio (0,2 g/l) durante un min. El exceso de tiosulfato fue removido mediante dos lavados sucesivos con AD.

Tratamiento con plata

Los geles previamente sensibilizados fueron sumergidos en una solución de AgNO₃ (2,0 g/l) y se mantuvieron en oscuridad durante 30 min.

Posteriormente fueron lavados con AD 5 veces durante 10 s cada vez para remover el AgNO_3 en exceso.

Desarrollo de la coloración

Los geles se sumergieron en la solución de desarrollo hasta que no se observó la aparición de nuevas bandas, evitando la sobrecoloración del gel por depósito de precipitados de AgS . La reacción se detuvo sumergiendo los geles en solución de “stopping” durante 1 min.

Solución desarrolladora	
Na_2CO_3 anhidro	3,0 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	1 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución de “stopping”	
Ácido acético	2,5 ml
Tris	5,0 g
Agua c.s.p.	100 ml

Secado y almacenamiento de geles

Los geles se sumergieron en una solución de glicerol al 40% (v/v) durante 24 h a temperatura ambiente. Luego se colocaron entre 2 filminas, dejando un borde a su alrededor no menor a 3 cm. Estos bordes se mantuvieron bajo presión durante otras 24 h, agregando luego mayor presión sobre los geles durante 3 días o hasta que estos estuviesen deshidratados. Luego de esto, se recortaron los bordes y sellaron con cinta de papel.

En el caso de los geles teñidos con plata, se trataron previamente con una solución de metanol al 30% durante 30 min a 4 °C, seguido por otros 30 min en solución de glicerol al 3%.

2.5.1.3. Análisis de los geles por densitografía

Digitalización de los geles

La digitalización de los geles se llevó a cabo con un escáner UMAX modelo Astra 610P con una resolución de 300 dpi (24 bits, 16,7 millones de colores) y las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato TIFF no comprimido.

Análisis densitográfico

Las imágenes escaneadas fueron procesadas mediante el software Scion Image for Windows beta 4.0.2, (<http://www.scioncorp.com>) para la obtención de los correspondientes densitogramas.

2.5.2 . Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) es un método de alta resolución en el cual las proteínas son separadas en un gradiente continuo de pH cuando se aplica un campo eléctrico. En este gradiente las proteínas migran hasta llegar al pH correspondiente a su punto isoeléctrico (pI). Permite resolver muestras muy complejas y determinar diferentes valores de pI en una misma corrida, tanto en trabajos analíticos como preparativos.

Preparación de las muestras

Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 µg/µl y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a precipitarlas con 3 volúmenes de acetona fría (-20 °C), dejándolas reposar durante 20 min a -20 °C, para luego centrifugarlas a 10.000 rpm durante 15 min, redisolviendo el precipitado en agua bidestilada (en el caso de muestras con bajo contenido proteico el volumen final se redujo respecto al inicial de modo de lograr una concentración adecuada). Este procedimiento se repitió dos veces para disminuir al mínimo la presencia de iones en las muestras, dado que éstos producen distorsiones en las corridas.

Preparación de los geles

Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneamente. Para ello se adhirió firmemente la cara hidrofílica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio y el conjunto se invirtió sobre la bandeja. Para obtener dos geles es necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

Solución de poliacrilamida al 5%	
Acrilamida-bisacrilamida (25% T, 3% C)	2,0 ml
Agua bidestilada	5,5 ml
Anfolitos (Pharmalyte 3-10)	0,5 ml
Glicerol (25% P/V)	2,0 ml

La solución de poliacrilamida se degasificó en un kitasato conectado a una bomba de vacío durante 20 min y luego se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización:

Reactivos de polimerización	
Riboflavina (sol. saturada)	200 µl
TEMED	3 µl
PSA al 10%	60 µl

La mezcla fue depositada con pipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo tapado e inmóvil durante 2 h a temperatura ambiente y en presencia de luz para obtener la polimerización total. Al cabo de ese tiempo, los geles se removieron cuidadosamente con ayuda de una espátula delgada.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volumen de siembra 1-5 μ l y 7 siembras por placa, como máximo) permitiendo que difundan dentro del gel durante 5 min antes de iniciar el IEF.

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos con AD) de la celda de IEF, con la cara del gel sembrado hacia abajo. La celda se cerró herméticamente y se conectó a la fuente de poder.

El enfoque se llevó a cabo en tres etapas, a voltaje constante: 100 V durante los primeros 15 min, 200 V durante los siguientes 15 min y 450 V durante los 60 min finales.

Fijación y Coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles se separaron de las placas de vidrio y fueron sumergidos durante 30 min en la siguiente solución fijadora:

Solución fijadora	
Acido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
TCA	12,5 g
AD, c.s.p.	100 ml

Finalizada la etapa anterior, los geles se trataron durante 2 h con la solución colorante y luego fueron decolorados por tres lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro.

Solución colorante	
CuSO ₄ (disolver primero en agua)	500 mg
Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie brilliant blue R-250	40 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante I	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO ₄	500 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante II	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Estimación de los pI

Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de pI [Broad pI kit, GE Health Care, Biosciences: Amiloglucosidasa (pI 3,50); Inhibidor de Tripsina (pI 4,55); β-Lactoglobulina A (pI 5,20); Anhidrasa carbónica B, bovina (pI 5,85); Anhidrasa carbónica B, humana (pI 6,55); Mioglobina, banda ácida (pI 6,85); Mioglobina, banda básica (pI 7,35); Lentil lectina, ácida (pI 8,15); Lentil lectina, media (pI 8,45); Lentil lectina, básica (pI 8,65) y Tripsinógeno (pI 9,30)].

La determinación de los valores de pI se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por ellas, tomando como referencia la posición del cátodo.

2.5.2.1. Detección de actividad caseinolítica en geles: Zimograma

Preparación de las placas de agarosa-caseína

Las placas de agarosa se prepararon sobre una película plástica (Agarose GelBond, GE Health Care, Biosciences) de un tamaño aproximadamente igual al del gel de poliacrilamida. Sobre el lado hidrofílico de la película se depositó una solución de agarosa al 1% en glicina-NaOH 0,1 M de pH 9,75 (0,15 ml/cm²). Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida durante 20 min en una solución de caseína al 1% conteniendo cisteína 20 mM en el buffer adecuado, enjuagada con AD y escurrida durante 10 min (Westergaard *et al.*, 1980).

Para confirmar cuáles fracciones proteicas presentan actividad proteolítica, los geles de IEF sin teñir se pusieron en contacto con un gel de agarosa-caseína al 1 % .

Incubación

El gel de poliacrilamida fue dispuesto sobre la placa de agarosa-caseína evitando la formación de burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 50 °C durante 10 min.

Fijación y coloración

Una vez finalizado el período de incubación, los geles fueron separados y la placa de agarosa-caseína sumergida durante 60 min en la solución fijadora cuya composición se indica a continuación:

Solución fijadora	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	45 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Una vez fijadas las proteínas, la placa de agarosa-caseína fue deshidratada entre papeles de filtro Whatman 3MM por aplicación de una presión de 7,5 g/cm² durante 20 min. Luego fue secada con pistola de aire y sumergida durante 10-30 min en la siguiente solución colorante:

Solución colorante	
Coomassie brilliant blue R-250	250 mg
Solución fijadora, c.s.p.	100 ml

La decoloración se realizó por inmersión de la placa de agarosa-caseína en la solución fijadora durante 10 min y luego se secó con pistola de aire.

3. PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

3.1. Cromatografía de intercambio iónico

Araujia angustifolia

La purificación se realizó utilizando un sistema FPLC de GE Health Care, Biosciences, con bombas peristálticas B - 500, unidad de control UV - 1, programador GP - 250 Plus, unidad óptica UV - 1; válvula V - 7, mezclador Mixer, colector de fracciones FRAC - 100 y registrador REC 112.

Se emplearon como soportes para la cromatografía SP - Sepharose HP y Q - Sepharose HP, empaquetados en columnas XK 16/40 con adaptadores K16 (GE, Health Care, Biosciences).

La purificación de los componentes proteolíticos fue realizada por cromatografía de intercambio catiónico. Un ml de extracto crudo conteniendo 1,5 mg de proteínas fue sembrado en una columna de intercambio catiónico Pharmacia XK 16/40 con adaptadores AK16, empaquetada con relleno SP-Sepharose Fast Flow y equilibrada con 0,055 M Tris-HCl (pH 7,4) y posteriormente eluida con un gradiente de NaCl (0-0,5, 0,5-0,8 y 0,8-2,0 M) en el mismo buffer. La cromatografía de intercambio catiónico fue monitoreada espectrofotométricamente por lectura de la absorbancia a 280 nm.

Araujia hortorum

El extracto crudo fue purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico en el equipo mencionado anteriormente utilizando una columna (Pharmacia K 15/30) rellena con CM Sepharose CL-6B Fast Flow, equilibrada y lavada con buffer cítrico fosfato 55 mM de pH 6,4. Se sembraron 14 ml de extracto crudo conteniendo 75 mg de proteínas y la elución fue realizada con un gradiente lineal de ClNa (0-0,6 M) en el mismo buffer.

En ambos casos la actividad caseinolítica, la cantidad de proteínas y el contenido de péptidos (reacción de Biuret) fue testada en las fracciones eluidas.

3.2. Caracterización de las fracciones purificadas

3.2.1. Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas de cada una de las fracciones purificadas fue evaluado por el método de Bradford según se indica en el ítem 2.2.1 de M&M.

3.2.2. Actividad peptidásica

La actividad caseinolítica fue determinada tal como se indicó en el ítem 2.3.6. de M&M.

3.2.2.1. Perfil de pH de la actividad proteolítica

El perfil de de las enzimas purificadas se ensayó según el protocolo descrito en el ítem 2.4.1. de M&M.

3.2.2.2. Efecto de inhibidores

El mecanismo catalítico de las enzimas puras fue determinado utilizando inhibidores específicos de proteasas, tal como se describió en el punto 2.4.2.

3.2.3. Actividad esterolítica

La actividad endoesterolítica de cada enzima purificada se determinó utilizando los derivados N- α -carbобензохи-*p*-nitro fenil ésteres de aminoácidos de acuerdo al método descrito en el ítem 2.3.1.

3.2.4. Actividad amidásica

Según se indica en el punto 2.3.2. se utilizó L-pirolutamil-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) 4mM para medir actividad amidásica.

3.2.5. Electroforesis de alta resolución con Tris-tricina y Electroforesis en gradiente de poliacrilamida

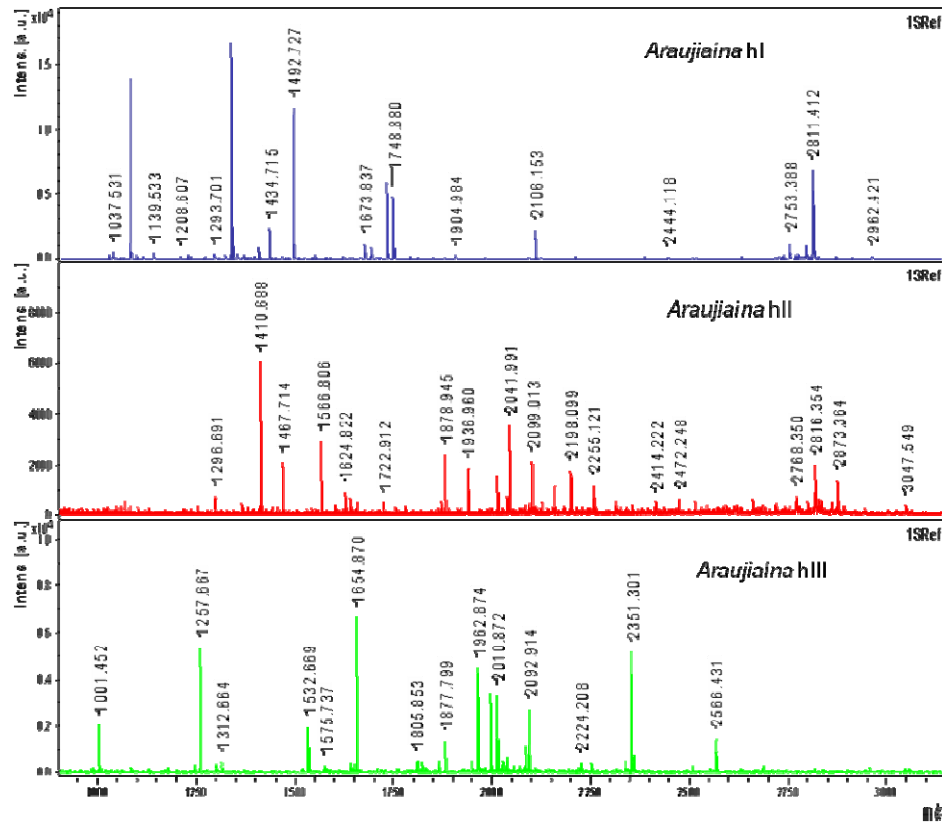
Se realizaron estas electroforesis con el objeto de verificar el proceso de purificación de las proteasas a partir de los extractos crudos. Ver apartado 2.5.1.1.2. y 2.5.1.1.3., respectivamente.

3.2.6. Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} se emplearon como sustratos sintéticos L-pirolutamil-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) y los derivados N- α -carbобензохи-*p*-nitro fenil ésteres de aminoácidos por los que cada una de las enzimas ensayadas presentaron mayor preferencia.

La valoración de tales parámetros fue realizada de acuerdo al método descrito previamente para estos sustratos, tal como se describió en los ítems 2.3.2 y 2.3.1., respectivamente.

La velocidad inicial de la reacción fue determinada monitoreando cada 10 s durante 3 min la absorbancia correspondiente para cada caso. El k_{cat} y el K_m fueron calculados usando el análisis de regresión no linealizada de la ecuación de Michaelis-Menten. En cada caso se utilizaron nueve concentraciones de sustrato en el rango 1,25 - 60 μM .



MATERIALES & MÉTODOS

*Metodología
de las Ómicas*

METODOLOGÍA DE LAS ÓMICAS

1. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS PROTEASAS AISLADAS

Los espectros de masas de las proteasas puras fueron obtenidos utilizando un equipo MALDI – TOF (Matrix–Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) y se usaron para determinar la masa molecular y el grado de pureza de las fracciones cromatográficas activas.

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon mezclando una solución saturada de la matriz en ácido trifluoracético 0,1 % en agua Mili-Q con acetonitrilo (ACN) en relación 2:1 en un tubo plástico de 200 µl de capacidad, se mezcló 1-2 µl de esta solución de cristalización con 1 µl de la muestra a ser ensayada.

Se depositaron 0,5 a 1 µl de esta mezcla sobre la placa para MALDI-TOF MS y se dejaron cristalizar. Para la calibración se utilizaron, en el caso del análisis de péptidos, una mezcla de patrones Brucker Daltonik GmbH: Bradiquinina, [1-7 (757,39916)], Angiotensina II (1046,5418), Angiotensina (1296,6848), Sustancia P (1347,7354), Bombesina (1619,8223), Sustrato de Renina (1758,93261), Hormona Adrenocorticotrópica: ACTH clip [1-17 (2093,0862)], Hormona Adrenocorticotrópica: ACTH clip [18-39 (2465,1983)] y Somatostatina [28 (3147,4710)], mientras que para la determinación de la masa molecular de las muestras purificadas se utilizó tripsinógeno como calibrador (M+1 23981, M+2 11990,5).

Dependiendo del tipo de muestra se utilizaron diferentes placas: MP 384 Polished Steel y MP 384 Ground Steel (Broker) para proteínas y péptidos, en tanto que en el caso de muestras con muy baja concentración de péptidos se utilizó una placa MTP 384 AnchorChip (Bruker) que tiene una sensibilidad 30 veces superior a la MP 384 Ground Steel.

Las matrices utilizadas se indican a continuación:

Solución de ácido sinapínico (SA, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico)	
SA (Sigma)	10 mg
ACN	600 µl
Ácido trifluoroacético (TFA)	1 µl
Agua MilliQ, c.s.p.	1000 µl
Agitar y centrifugar a 10.000 rpm durante 3 min	

Solución de α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA)	
HCCA (Brucker Daltonik GmbH)	10 mg
ACN	600 µl
TFA	1 µl
Agua MilliQ, c.s.p.	1000 µl

Solución de 2,5-dihidroxiacetofenona (DHAP)	
DHAP (Sigma)	10 mg
ACN	200 µl
Citrato amónico dibásico 0,5 M	40 µl
Agua MilliQ	760 µl

Solución de 2-(4-hidroxifenilazo) benzoico (HABA)	
HABA (Sigma)	2 mg
ACN	300 µl
Citrato amónico dibásico 0,5 M	40 µl
Agua Milli-Q	660 µl

Solución de ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB)	
DHB (Sigma)	50 mg
ACN	800 µl
TFA	1 µl
Agua MilliQ c.s.p.	1000 µl

Obtención de los espectros de masas

Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker modelo Ultraflex TOF-TOF equipado con un láser de N₂ (337 nm con pulsos de 1-5 ns) en un modo lineal de iones positivos, y utilizando una fuente de aceleración de iones de 19 kV.

Los parámetros utilizados para la adquisición de los espectros fueron ajustados para cada caso en particular.

2. SECUENCIA AMINOACÍDICA N-TERMINAL Y DE PÉPTIDOS INTERNOS

Las proteasas purificadas fueron adsorbidas sobre una membrana (Millipore) de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y lavadas varias veces con agua desionizada. La secuencia N-terminal se determinó por degradación de Edman automatizada. Se prepararon las muestras inmovilizando 10-100 pg de proteína pura sobre filtros de PVDF. Para ello se utilizó un tubo Ultrafree-Probind Filtres (Millipore), la membrana se activó tras hacer un lavado con 500 µl de metanol y posteriormente con 500 µl de agua MilliQ. Se cargó el tubo con la solución de la muestra y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min, procediendo luego a despegar el filtro de PVDF y a lavarlo varias veces con agua MilliQ. Finalmente se introdujo el filtro de PVDF con la proteína en la cámara de reacción del secuenciador de proteínas Beckman LF3000 equipado con un PTH -amino acid analyzer System Gold (Beckman).

Araujiaína hI (que presentó el N-terminal bloqueado) fue digerida con Proteasa V8 (endopeptidase Glu-C) usando una relación enzima-proteína 1:25 (w/w). Esta serín endopeptidasa cliva enlaces donde el -COOH es aportado por un residuo de Glu (Sprinsen *et al.*, 1991). Los péptidos obtenidos fueron separados por HPLC de fase reversa usando una columna Nova Pack C18 column (Waters) y un gradiente lineal de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua a TFA al 0,1% en acetonitrilo a una velocidad de 0,1 ml/min durante 60 minutos y luego fueron analizados por espectrometría de masas. Una

muestra del péptido principal fue fijada por adsorción en una membrana de PVDF (Millipore) y lavada varias veces con agua desionizada.

La secuenciación se realizó en un equipo automático basado en la técnica de Edman (LF3000 Protein Sequencer, Beckman equipado con un analizador de PTH-aminoácidos, Beckman). Una vez obtenida la información sobre la secuencia N-terminal, se determinó el grado de indentidad con otras proteínas, utilizando el servicio BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en Internet, indicando en la alineación los residuos específicos que son idénticos (“identidades”), así como los que son no idénticos pero que sin embargo tienen aminoácidos con características similares (“positivos”).

3. MAPA PEPTÍDICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)

3.1. Digestión trípica en geles de poliacrilamida

Para obtener la huella peptídica (peptide mass fingerprint, PMF) por MALDI-TOF MS (PMF MALDI-TOF MS) se hizo una digestión trípica *in situ* de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Lavado de las bandas

Lavar las bandas recortadas de la SDS-PAGE en trozos de aproximadamente 1 mm y transferirlas a tubos eppendorf con 100-150 µl de agua MilliQ, dejando reposar durante 5 min. Centrifugar y retirar el líquido. Añadir un volumen de acetonitrilo (ACN) equivalente al triple o al cuádruple del volumen que ocupan los trozos de la banda. Incubar 10-15 min. Centrifugar y retirar el líquido. Secar con vacío (10-15 min).

Reducción y carbamidometilación

Cubrir los trozos de gel con ditiotreitól 10 mM en NH_4HCO_3 100 mM e incubar durante 30 min a 56 °C. Centrifugar y retirar el líquido. Incubar los

fragmentos de gel con ACN durante 5 min. Retirar el líquido e incubar con iodoacetamida 50 mM en NH_4HCO_3 100 mM (la solución deberá ser preparada en el momento de ser utilizada) durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Retirar el líquido y lavar con 150-200 μl de NH_4HCO_3 100 mM durante 15 min. Centrifugar y retirar el líquido. Incubar 5 min con ACN. Centrifugar, retirar el líquido y secar a vacío (10-15 min).

Decoloración de los fragmentos

Rehidratar con 100-150 μl de NH_4HCO_3 100 mM durante 15 min; a continuación, sin retirar el líquido, añadir un volumen igual de ACN. Luego agitar durante 20 min, centrifugar y retirar el líquido. Incubar 5 min con ACN. Retirar el líquido y secar a vacío (10-15 min). Este proceso puede repetirse para eliminar la mayor cantidad posible de colorante. Sólo se realiza en caso de apreciar restos de colorante.

Digestión trípica y extracción de los productos de digestión

Rehidratar los fragmentos con NH_4HCO_3 25 mM a 4 °C durante 40 min. Retirar el sobrenadante y cubrir los fragmentos con buffer de digestión con tripsina. Incubar a 37°C durante toda la noche. Comprobar que el líquido cubra los fragmentos. Centrifugar y pasar el sobrenadante a un tubo limpio. Incubar los trozos de gel a 37°C durante 15 min con NH_4HCO_3 25 mM y agitar. Centrifugar y cubrir con ACN los fragmentos de gel. Incubar a 37°C durante 15 min con agitación. Centrifugar y reunir el sobrenadante obtenido con el anterior. Centrifugar y añadir ACN (1-2 veces el volumen de los fragmentos). Incubar a 37 °C durante 15 min con agitación. Centrifugar y reunir el sobrenadante con los anteriores. Secar los sobrenadantes por centrifugación con vacío utilizando una centrífuga SpeedVac, tratar con 20 μl de agua Milli-Q y repetir el proceso de secado.

3.2. Análisis de los péptidos obtenidos

Redissolver en 5 µl de TFA 0,1% (v/v) y analizar por MALDI-TOF MS utilizando una matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) para obtener los Peptide Mass Fingerprint (PMF).

Análisis de los mapas peptídicos.

Los resultados obtenidos por MALDI-TOF MS son procesados mediante el software MASCOT. <http://www.matrixscience.com>

4. CLONADO DE PROTEASAS

4.1. Diseño de cebadores (primers) específicos

El diseño de primers específicos se realizó a partir de secuencias aminoacídicas de las regiones más conservadas de proteasas cisteínicas de la familia *Apocynaceae*. Para seleccionar los aminoácidos más convenientes, el diseño se centró en la porción N-terminal y en la región del sitio activo que contiene a la Cys de la díada catalítica. Para obtener las secuencias nucleotídicas correspondientes a dichos residuos aminoacídicos se utilizó la herramienta *Backtranslation Tool* disponible en la Web (<http://www.entelechon.com/bioinformatics/backtranslation.php?lang=eng>). En las siguientes tablas se muestran los cuatro primers diseñados y las secuencias aminoacídicas utilizadas para tal fin en cada caso:

Primer NT Apocinaceas: NTapo1 5'GTTGAATTGCCAGATTCTGTAGATTGG 3'		
Material vegetal	Secuencia	Referencia
Asclepaina f	VELPDSVDWR EKG VVFPI RNQ GK	Trejo, 2005
Morrenaina o II	LPDSVDWR KKNLVFPVRNQ GK	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2001
Araujaina h II	VPDSIDWREKDAVLP I RNQ GQ	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Araujaina h III	LPESVDWR KKNLVFPVRNQ GQ	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Asclepaina c I	LPNSVDWR QKG VVFPI RDQ GK	Liggieri <i>et al.</i> , 2004
Funastraina c II	LPNSVDWR QKG VVSAI RNQ GK	Morcelle del Valle <i>et al.</i> , 2004
Asclepaina c II	LP SFVDWR QKG VVFPI RNQ GQ	Comunicación personal

Primer NT Apocinaceas: NTapo2 5'CCAGATTCTGTAGATTGGCGG 3'		
Material vegetal	Secuencia	Referencia
Asclepaina f	L PDSVDWR EKG VVFPIRNQ GK	Trejo <i>et al.</i> , 2001
Morrenaina o II	L PDSVDWR KKNLVFPVRNQ GK	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2001
Araujaina h II	V PDSIDWR EKDAVLPIRNQ GQ	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Araujaina h III	L PE SVDWR KKNLVFPVRNQ GQ	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Asclepaina c I	L PNSVDWR QKGVVFPIRDQ GK	Liggieri <i>et al.</i> , 2004
Funastraina c II	L PNSVDWR QKGVVSAIRNQ GK	Morcelle del Valle <i>et al.</i> , 2004
Asclepaina c II	L PSFVDWR QKGVVFPIRNQ GQ	Comunicación personal

Primer CA Apocinaceas: CAapo1 5'CCTATCAGAAATCAAGGAAAATGTGGGAGTTGCTGG 3'		
Material vegetal	Secuencia	Referencia
Asclepaina f	LPDSVDWREKGVVFP PIRNQ GKCGSCW TFSA	Trejo 2005
Asclepaina c I	LPNSVDWRQKGVVFP PIRDQ GKCGSCW TFSA	Liggieri <i>et al.</i> , 2004
Asclepaina c II	LPSFVDWRQKGVVFP PIRNQ QCGSCW TFSA	Comunicación personal

Primer CA Apocinaceas 2: CAapo2 5'ATCAAGGAAAATGTGGGAGTTGCTGG 3'		
Material vegetal	Secuencia	Referencia
Asclepaina f	LPDSVDWREKGVVFP IRNQ GKCGSCW TFSA	Trejo 2005
Asclepaina c I	LPNSVDWRQKGVVFP IRDQ GKCGSCW TFSA	Liggieri <i>et al.</i> , 2004
Asclepaina c II	LPSFVDWRQKGVVFP IRNQ QCGSCW TFSA	Comunicación personal

También fue utilizado el primer Nd₁₋₈ (5'yTkCCdGATTCCGATGTTTGGmG 3'), diseñado para la obtención del cDNA de asclepaina f (Trejo, 2005), ya que se ha comprobado su eficacia para el aislamiento de cDNAs de otras cisteínproteasas provenientes del látex de plantas que han sido purificadas y clonadas en nuestro laboratorio.

4.2. Aislamiento del cDNA

4.2.1. Extracción del RNA Total

Con el fin de extraer el RNA del látex de *A. angustifolia* se utilizó el kit RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen. Se recolectaron 5 gotas de látex (50 mg) sobre 350 µl de buffer RLC del kit conteniendo 3,5 µl de β-mercaptoetanol y luego se procedió a la extracción siguiendo las indicaciones descriptas por el fabricante empleando cromatografía en microcolumnas. El RNA se eluyó con 50 µl de agua libre de RNasas, se le adicionó 1 µl de inhibidor de RNasas (Roche) y se concentró 5 veces por centrifugación en vacío.

4.2.2. RACE-PCR

La RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends-Polimerase Chain Reaction: amplificación rápida de extremos de cDNA-reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que se diseñó para conocer la secuencia de los extremos de un RNA (Frohman *et al.*, 1988). Con este método se generan cDNAs (obtenidos por PCR) que incluyen copia de la secuencia del extremo 3' o 5' del RNA (3'RACE o 5'RACE, respectivamente). La estrategia consiste en añadir una secuencia diana (secuencia inespecífica) en el extremo del cDNA que se desea obtener para luego, empleando además un primer específico, amplificar una secuencia del gen buscado.

La 3'RACE-PCR consta de una primera etapa de retrotranscripción (RT) en la que se adiciona la secuencia diana unida a un homopolímero polidT y de una segunda etapa en la que se amplifican por PCR los cDNAs específicos utilizando dos primers, uno correspondiente a la secuencia del gen buscado y otro a la secuencia diana.

4.2.2.1. Reacción de retrotranscripción (RT)

Para la obtención de la primer cadena de cDNA se utilizó un kit comercial Roche "First Strand cDNA Síntesis Kit for RT-PCR", AMV (Avian Myeloblastosis Virus: Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de aves), y se diseñó un primer con una diana en el extremo 5' seguida del polidT en el extremo 3' (R0R1polidT).

RoR ₁ polidT	5'-CCGGAATTCAGTGCAGGGTACCCAATACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
R ₀	5'-CCGGAATTCAGTGCAG-3'
R ₁	5'-GGTACCCAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Como paso previo a la reacción de RT, el RNA fue sometido a un tratamiento térmico (15 min a 65 °C y 5 min en baño de hielo) para provocar la ruptura de su estructura secundaria.

Mezcla de reacción de RT	
Buffer de reacción 10× (Roche)	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	4 µl
dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 2,5 mM c/u)	2 µl
Primer R0R1polidT 25 µM	2 µl
Inhibidor de RNasas 50 U/µl	1 µl
Transcriptasa reversa AMV	1 µl
RNA desnaturalizado	8 µl

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Bioer Modelo XPCycler: 10 min a 25 °C, 120 min a 42 °C, 5 min a 99 °C y 5 min a 10 °C.

Como control positivo de la retrotranscripción se utilizaron random primers (hexámeros degenerados de composición n6, donde n puede ser A, T, C o G).

4.2.2.2. Reacción de PCR

Para aislar los productos específicos de la reacción se hizo una PCR utilizando primers específicos.

Los productos de la reacción anterior (cfr. 4.2.2.1.) fueron diluidos 10 veces con agua MilliQ estéril y una alícuota de esta solución fue utilizada como molde (cDNA molde) de la reacción de PCR. En la siguiente tabla se describe la composición de la mezcla de reacción.

La reacción se llevó a cabo utilizando el mismo termociclador que se empleó anteriormente y con el siguiente programa: [1x (5 min a 95 °C, 15 min a 72 °C), 30x (1 min a 94 °C, 1 min a 46 °C, 2 min a 72 °C), 1x (15 min a 72 °C), 1x (16 h a 10 °C)]. Como control de RT-PCR se utilizó como molde en la reacción de PCR una alícuota del RNA total. Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

4.3. Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron utilizados para el análisis de las muestras conteniendo DNA. La agarosa tiene menor poder de resolución que la poliacrilamida, pero mayor rango de separación (50 pb hasta algunos megabases de longitud). Pequeños fragmentos (20 pb - 20.000 pb) son mejor resueltos en geles horizontales de agarosa con un campo eléctrico de fuerza y dirección constante.

Se utilizaron dos equipos diferentes de la casa comercial Serva, Blue Marine 100 para geles de 7x10 cm y Blue Marine 200 para geles de 15x15 cm o 15x20 cm. La fuente utilizada fue Biotech EPS 200 de GE HealthCare, Biosciences.

Preparación de las muestras

A las muestras de DNA, previamente a ser sembradas en el gel, se les añadió una décima parte en volumen de buffer de muestra 10x.

Buffer Tris-acético-EDTA (TAE) 50X	
Tris base	242 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
Ácido acético glacial	57,1 ml
Agua MilliQ c.s.p.	500 ml

Buffer de muestra 10X	
Buffer TAE 50X	1 ml
Glicerol	5 ml
Orange G	15 mg
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml

Preparación de los geles

Los geles fueron preparados empleando el bastidor plástico correspondiente al equipo utilizado en cada caso (Blue Marine 100 y BlueMarine 200). La solución fue preparada de la siguiente manera:

Geles de agarosa	2%	1%
Agarosa	2 g	1 g
Buffer TAE	100 ml	100 ml
Calentar a ebullición hasta transparentización. Enfriar hasta 60 °C		
Bromuro de Etidio (10 mg/ml)	2 µl	2 µl

Luego de verter esta mezcla en la placa se dejó enfriar hasta su gelificación. Se utilizaron peines de 1 mm de espesor con 8 calles para los geles de 7 cm de longitud, mientras que para los geles de 15 cm de longitud se utilizaron peines de 1 mm y 2 mm de espesor con 16 calles.

Condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron bajo buffer con pipeta automática de 20 µl. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante manteniendo una relación de 10 mV por cada cm de longitud de gel, empleando buffer de corrida TAE.

4.4. Nested PCR

Con el objeto de confirmar que las bandas observadas en la electroforesis de los productos de PCR corresponden a la secuencia del gen buscado se realizó una reacción de Nested PCR (PCR anidada).

Esta técnica comprende dos reacciones de PCR sucesivas con dos pares de primers específicos distintos, de tal modo que cada uno de los primers utilizados en la segunda PCR (internal o nested PCR) contengan parte de la secuencia de los primers utilizados en la primera PCR y la porción contigua

amplificada en la PCR inicial (external PCR). El método de la Nested PCR se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del DNA de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas (si el resultado de la primera PCR da productos inespecíficos, el segundo par de primers internos no hallará secuencia complementaria y, por consiguiente, no habrá amplificación).

Las condiciones de reacción fueron las mismas que se indicaron en el ítem 4.2.2.2. En este caso los primers internos utilizados fueron CAapo1 y R1. Así mismo se utilizó la combinación de los primers CAapo2 y Ro con el fin de ensayar otra variante en la reacción de amplificación.

4.5 Purificación de Fragmentos de DNA

Habiéndose confirmado mediante electroforesis la presencia de bandas del tamaño esperado en los productos de PCR (cfr. 4.4) se procedió a la purificación del DNA. Las bandas de DNA seleccionadas fueron recortadas del gel de agarosa bajo luz UV y tratadas con un kit de extracción de DNA (QIAEX II Agarose Gel Extraction, QIAGEN GmbH).

4.6. Clonado del cDNA

El cDNA aislado fue clonado utilizando una cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (Sambrook *et al.*, 1989) y el vector pGEM-T Easy, Promega.

4.6.1 Medios de cultivo utilizados:

4.6.1.1. Medios de cultivo líquidos

Medio 2YT	
Bacto-Triptona	16 g
Bacto-Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a T° ambiente.	

Medio Luria-Bertani (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a T° ambiente.	

4.6.1.2 Medios de cultivo sólidos

Para preparar placas de cultivo se trabajó en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo. Cuando la temperatura del medio de cultivo alcanzó los 60 °C se cargaron las placas de Petri (9 cm de diámetro) con aproximadamente 20 ml de medio fundido cada una y se dejaron solidificar bajo campana de flujo. Las cajas fueron luego tapadas, colocadas durante 30 min en estufa a 37 °C y conservadas a 4 °C.

Medio LB	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M	
AD, c.s.p.	1 l
Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Enfriar a 60 °C en estufa antes de plaquear.	

4.6.1.3 Reactivos adicionales

Solución de 5-Br-4-Cl-3-Indol- β -D-galactósido 20 mg/ml (X-Gal)	
X-Gal, Roche	400 mg
N,N'-dimetilformamida, Sigma c.s.p.	20 ml
Conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

Solución de ampicilina (100 mg/ml)	
Ampicilina (Sigma)	1 g
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

Solución de Isopropil - β -D- tiogalactósido 0,1 M (IPTG*)	
IPTG, Roche	1,19 g
Agua MilliQ c.s.p.	50 ml
Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.	

* IPTG es un análogo no fermentable de la lactosa que inactiva al represor del operón lacZ.

4.6.3.2. Obtención de células *E. coli* competentes

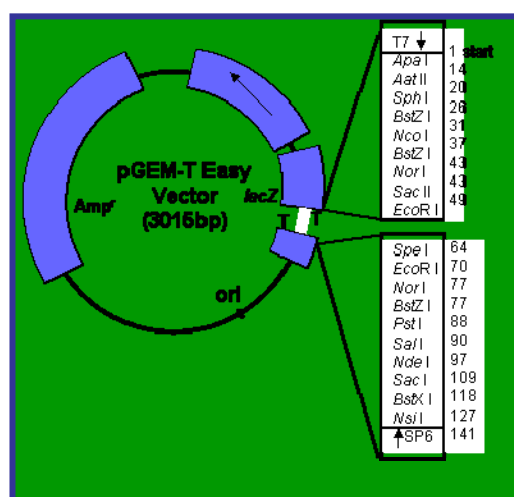
Se procedió según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se partió de un cultivo puro en etapa de crecimiento exponencial, para lo cual se inocularon las células de una colonia de *E. coli* aislada de un cultivo en placa LB (cfr. 4.6.1.2.) en 5 ml de medio de cultivo 2YT (cfr. 4.6.1.1.) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche con agitación a 250 rpm. Una alícuota de 100 μ l de este cultivo fue inoculada en 10 ml de medio fresco y se hizo crecer en las mismas condiciones hasta una densidad óptica de 0,6 (DO_{550nm}).

El cultivo obtenido en estas condiciones se mantuvo en baño de hielo durante 10 min y luego se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 3000 rpm. Trabajando bajo campana de flujo se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de CaCl₂ 0,05 M estéril. Nuevamente se dejó en baño de hielo durante 10 min, se centrifugó como se indicó anteriormente y luego de descartar el sobrenadante asépticamente las células fueron cuidadosamente resuspendidas en 1 ml de CaCl₂ estéril 0,05 M preenfriado a 4 °C.

La suspensión de células fue almacenada en heladera a 4 °C durante toda la noche, luego se tomaron alícuotas de 100 µl y a cada una de ellas se le adicionó 23 µl de glicerol 80% (v/v) estéril. Cada alícuota de suspensión de células competentes fue almacenada a -80 °C hasta el momento de ser utilizada.

4.7. Clonación

El vector pGEM-T Easy contiene los promotores de las RNA polimerasas T7 y SP6, flanqueando una zona de clonado múltiple dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*), lo que permite secuenciar el inserto introducido en el vector empleando los *primers* correspondientes. La zona de clonado múltiple incluye sitios de digestión para diferentes enzimas de restricción, lo que permite la liberación de insertos. En cada uno de sus extremos lleva además una timidina 3' terminal, lo que aumenta la eficiencia de ligación con productos de PCR obtenidos con DNA polimerasas sin actividad de 3'→5' exonucleasa, las que suelen añadir una adenina 3' terminal. El vector posee además una región que codifica para la β -lactamasa (*Amp^r*), con lo que las bacterias sensibles a ampicilina se vuelven resistentes al ser transformadas con el vector pGEM-T Easy.



Cuando se liga un inserto al vector se produce una interrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la β -galactosidasa, lo que impide la

expresión de esta enzima. Dado que la acción de la β -galactosidasa sobre el X-Gal hace que se libere un compuesto de color azul, la inserción de un fragmento de DNA en el vector se evidencia por la ausencia de color azul.

4.7.1. Ligación

Los fragmentos de DNA seleccionados y purificados fueron ligados al vector pGEM-T Easy. La mezcla de ligación se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mezcla de Ligación	
Buffer de ligación 2X, Promega	5 μ l
Vector pGEM-T Easy 50 ng/ μ l	1 μ l
DNA (cfr. 4.5)	3 μ l
DNA ligasa T4 3 U/ μ l, Promega	1 μ l
Incubar a 4 °C toda la noche	

4.7.2. Transformación y Selección de los clones

La transformación se realizó agregando 10 μ l de la mezcla de ligación (cfr. 4.7.1) a una alícuota de 100 μ l de *E. coli* (XL1-Blue) competentes (cfr. 4.6.3.2.) siguiendo un protocolo de shock térmico (30 min en hielo, 90 s a 42 °C y finalmente 5 min en hielo).

A la suspensión de células proveniente de la mezcla de transformación se le añadió 300 μ l de medio LB (cfr. 4.6.1.2.) y se incubó durante 15 min a 37 °C en estufa de cultivo y luego se centrifugó 2 min a 2000 rpm. A partir de aquí se trabajó en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo. Se desecharon 200 μ l de sobrenadante, las células fueron cuidadosamente resuspendidas en el sobrenadante restante y trasvasadas con pipeta automática a una placa de Petri con medio LB (cfr. 4.6.1.2.) conteniendo ampicilina (100 μ g/ml), IPTG (112 μ g/ml) y X-Gal (80 μ g/ml). Utilizando una espátula de Digralsky se extendió homogéneamente la suspensión de células y luego de secar los restos de humedad bajo campana se incubó durante toda la noche en estufa a 37 °C.

La selección de los clones se basa en las observaciones que se describen en la siguiente tabla:

Células sin vector	No crecen
Células con vector sin inserto	Colonias azules
Células con vector con inserto*	Colonias blancas

*Podrían dar colonias azules si el inserto tiene un número de bases múltiplo de tres.

Las colonias blancas fueron seleccionadas para verificar por PCR que contuvieran el inserto buscado. Cada una de ellas fue aislada con un palillo de madera estéril y colocada en un tubo eppendorf para realizar la reacción de PCR (cfr. 4.2.2.2.) utilizando primers específicos. En este caso los primers utilizados fueron el CAapo1 y el R1 (cfr. 4.1). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% (cfr.4.3).

Por otra parte, se prepararon inóculos con el fin de obtener cultivos que permitan inmortalizar los clones. A tal efecto cada uno de los palillos utilizados anteriormente, conteniendo remanentes de la colonia aislada, fue introducido en un tubo conteniendo 3 ml de medio de cultivo LBA [LB (cfr. 4.6.1.2.) con 50 µg/ml de ampicilina (cfr. 4.6.1.3.)]. Los inóculos de cada uno de los clones fueron incubados a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche.

4.7.3. Glicerinado de los clones

Se tomó una alícuota de 400 µl de cada cultivo creciendo en fase exponencial (cfr. 2.9.3.4) a la que se le añadió 92 µl de glicerol 80% (v/v) estéril; cada suspensión fue rápidamente homogeneizada y congelada a -80 °C. Los clones así tratados pueden ser conservados por largos períodos.

4.8. Secuenciación del cDNA Clonado

4.8.1. Aislamiento de DNA plasmídico

Se utilizó un kit de extracción, GFX Micro Plasmid Prep Kit, (GE HealthCare, Biosciences). La técnica consiste en lisar las células y eliminar restos celulares y proteínas. Luego el DNA plasmídico queda retenido en pequeñas columnas cromatográficas y es eluido con agua MilliQ estéril.

Para obtener el DNA plasmídico se tomó una alícuota de 1,5 ml proveniente del cultivo de interés. Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 s y se eliminó el sobrenadante. Las células obtenidas fueron lisadas con el buffer de lisis y en el mismo tubo se agregaron los buffer de precipitación, eliminando el sólido por centrifugación. El sobrenadante fue pasado a través de la columna cromatográfica quedando retenido el DNA plasmídico. Luego de los pasos de lavado se realizó la elución con agua Milli-Q estéril.

4.8.2. Digestión con enzimas de restricción

Esta etapa fue realizada con dos objetivos diferentes: para determinar la cantidad de DNA plasmídico presente en una muestra o para confirmar la presencia de insertos específicos dentro del vector en cuestión. Se utilizó el protocolo descripto a continuación.

Digestión de DNA con enzimas de restricción	
Buffer de reacción 10X (específico para cada enzima)	1 µl
Enzima de restricción	1 µl
Muestra de DNA	1 µl
Agua Milli-Q	7 µl
Incubar en estufa a 37 °C durante 2 h	

Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (cfr.4.3.).

4.8.3. Secuenciación del DNA

Las muestras fueron secuenciadas a través de los servicios de secuenciación de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España). Los cromatogramas fueron analizados con el programa Chromas v2.13 (Copyright©) 1988-2001 Technelysium Pty. Ltd.

4.8.4. Análisis de las secuencias de los cDNAs

Las secuencias obtenidas de los cDNAs de los clones fueron analizadas con un software de alineamiento [Clustal-W (Thompson *et al.*, 1994)] para obtener una secuencia consenso. La secuencia consenso fue traducida en los seis marcos de lectura con el software *Translate Tool* disponible en el servidor de ExPASy para poder identificar la presencia de elementos conservados en la secuencia aminoacídica de cisteínendopeptidasas. Al mismo tiempo se hizo una búsqueda por PSI-BLAST utilizando la base de datos NCBI nr y restringiéndola al reino *Viridiplantae*.

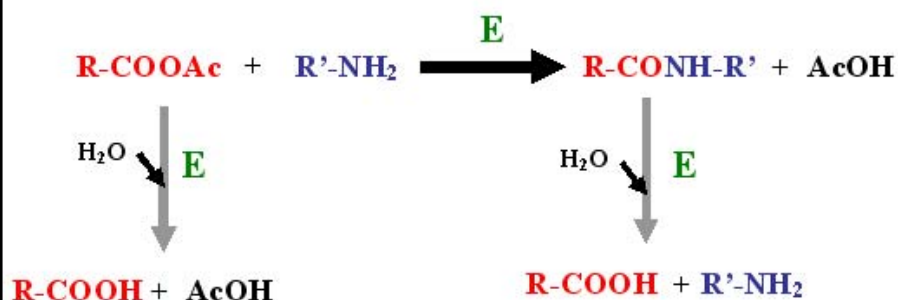
El cálculo teórico de propiedades fisicoquímicas fue obtenido a través de un programa de software (GPMW v6.0) y los valores obtenidos fueron comparados posteriormente con los datos determinados experimentalmente.

5. MODELADO POR HOMOLOGÍA. BIOINFORMÁTICA

El modelado por homología utiliza estructuras de proteínas resueltas por técnicas experimentales como referencia para predecir la conformación de la proteína en estudio. Para poder aplicar este método de predicción es necesario que la proteína a modelar posea un grado mínimo (35%) de identidad con las proteínas de referencia.

Para la obtención del modelo de araujiáina aII se utilizó la herramienta web “Swiss Model Server” (<http://swissmodel.expasy.org/>)

Control Cinético



MATERIALES & MÉTODOS

*Inmovilización Enzimática
& Síntesis Peptídica*

CAPACIDAD DE LOS EC PARA SÍNTESIS PEPTÍDICA

Para poder llevar a cabo la síntesis enzimática de compuestos bioactivos en medios no convencionales es necesario conocer el comportamiento de las enzimas en dichos medios. Para ello se realizaron determinaciones de estabilidad de las enzimas utilizando sustratos naturales y sintéticos en medios monofásicos y bifásicos, verificando la actividad enzimática residual a lo largo del tiempo (Priolo *et al.*, 2000; Priolo *et al.*, 2001; Quiroga *et al.*, 2005 a,b; Barberis *et al.*, 2005).

Además se evaluaron diferentes sistemas de inmovilización en distintos soportes a fin de seleccionar el que brinde mayor rendimiento, para luego utilizarlo en la síntesis de péptidos. Posteriormente se ensayó la síntesis peptídica planteada en los objetivos empleando el mejor medio no convencional y el mejor sistema de inmovilización encontrados para el EC de *Araujia hortorum*.

1. INMOVILIZACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Teniendo en cuenta que para los ensayos de biocatálisis en medio orgánico las enzimas deben encontrarse ya sea en estado sólido (liofilizadas o bien como polvos o precipitados acetónicos) o en forma inmovilizada, se procedió a probar el modo de inmovilizar las enzimas en la forma más conveniente, aunque para estos fines la sola adsorción o deposición sobre superficies no porosas (por ej. perlas de vidrio) es satisfactoria, ya que las enzimas son incapaces de desorberse desde la superficie en medios no acuosos de baja polaridad.

Una de las estrategias para evaluar y seleccionar el sistema de reacción contempla la posibilidad de utilizar al catalizador (en este caso, las proteasas del látex de *Araujia hortorum*) en fase sólida, lo que permitiría mayor estabilidad del mismo en los distintos medios a ensayar (acuoso y no acuoso) y su posible reutilización, siendo esta última una de las aplicaciones más interesantes y prometedoras.

Con los datos de estabilidad en medios no convencionales obtenidos en trabajos previos con la misma muestra se procedió al ensayo de inmovilización de las enzimas, buscando el mejor soporte que proporcione la mejor relación actividad de enzima inmovilizada versus actividad de enzima libre. Para ello se probaron distintos soportes que inmovilizan con diferentes mecanismos de acción, a los efectos de evaluar el que mejor conserve a la enzima y el que la haga más reutilizable.

Los soportes ensayados fueron la poliacrilamida (que une a la enzima por entrapamiento), la poliamida (que une a la enzima por adsorción) y la agarosa activada (que une a la enzima mediante uniones covalentes múltiples).

1.1. Entrampamiento en geles de poliacrilamida

Se trabajó con extracto crudo de *Araujia hortorum*, conteniendo 294,5 µg de proteína/ml. Se probaron geles de poliacrilamida al 8%, 10% y 14% para obtener diferentes tamaños de poro.

Para cada ensayo se tomó 1 ml de enzima, se añadió por separado sobre una solución de acrilamida-N,N'-metilen-bisacrilamida (30:0,8) y se llevó con buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8 al volumen final necesario para obtener el tamaño de poro deseado. Posteriormente se agregaron los iniciadores y los catalizadores de la polimerización (TEMED y persulfato de amonio). Inmediatamente se procedió a fraccionar la mezcla obtenida en varios tubos eppendorf utilizados como moldes para obtener los geles colocando 0,5 ml de la mezcla en cada uno. Luego de gelificar se extrajeron los geles obtenidos en cada tubo. Cada gel con la enzima entrapada adquirió una forma final de cono. Finalmente se determinó la actividad caseinolítica de cada uno de los geles obtenidos.

1.1.1. Actividad caseinolítica de las proteasas entrapadas

Los conos de poliacrilamida conteniendo las enzimas entrapadas se dejaron en contacto con caseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 9 a 50°C, con agitación constante (Caffini, 1990). A distintos tiempos se fueron

extrayendo muestras desde la mezcla de reacción y luego de precipitar con ácido tricloroacético al 5% se detectaron los productos de hidrólisis por medición de la absorbancia a 280 nm. En cada caso la actividad caseinolítica se expresó como absorbancia a 280 nm por mg de proteína entrampada.

1.2. Adsorción sobre poliamida.

Este método de inmovilización (adsorción de las enzimas sobre un soporte de material poroso, tal como Celite) es considerado como el más popular, aunque se trata más bien de un co-secado o deposición que de una inmovilización propiamente dicha (Gupta y Roy, 2004). Este tipo de preparación (enzima adsorbida sobre soportes sólidos) es fácilmente removido del medio de reacción, facilitando el aislamiento del producto y la reutilización de las enzimas (Adlercreutz, 1991).

El procedimiento consistió en liofilizar 15 ml de EC de *Araujia hortorum*, los cuales rindieron 96,4 mg de EC en polvo. El mismo se mezcló e inmovilizó por deposición sobre un soporte sólido (poliamida-6, EP-700, tamaño de partícula < 800 µm, diámetro de poro promedio 50 – 300 nm, área superficial según el método BET 8,4 m²/g; Azko, Alemania) según el siguiente procedimiento: 96,4 mg de enzima en polvo fueron disueltos en 1 ml de buffer bórico – borato 0,1 M de pH 8,5 con EDTA 1 mM y luego mezclado con 1 g de soporte en presencia de 50 mg de DTT. La mezcla resultante fue luego liofilizada (Clapés *et al.*, 1999; Morcelle *et al.*, 2006).

1.2.1. Evaluación de la actividad de las enzimas inmovilizadas sobre diferentes sustratos. Actividad enzimática remanente

La actividad de las enzimas inmovilizadas se determinó a 37 °C frente a distintos sustratos durante 5 min, con agitación orbital (150 rpm) en un agitador BioSan modelo OS-10 (amplitud del movimiento rotacional, 10 mm) deteniéndose la reacción mediante el agregado de AcH al 30%. Los sustratos empleados fueron N-α-carbobenzoxi-L-arginina-*p*-nitroanilida (Z-Arg-*p*NA, solución stock 1 mM en dimetilformamida, concentración final en el ensayo 0,1

mM) (Gebhard *et al.*, 2004), N α -benzoil-D,L-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA, solución stock 40 mM en DMSO, concentración en el ensayo 4 mM) (Murachi, 1970), N- α -carbобензохи-L-фенилаланил-L-аргинина-*p*-нитроанилида (Z-Phe-Arg-pNA, solución stock 1 mM en DMSO, concentración final en el ensayo 0,1 mM) en buffer fosfatos 0,1 M (pH 7,4) (Rowan y Buttle, 1994) y L-pirolglutamил-L-фенилаланил-L-леуцина-*p*-нитроанилида [PFLNA, solución stock 1 mM en dimetilsulfóxido (DMSO), concentración final en el ensayo 0,1 mM] en buffer fosfatos 0,1 M (pH 6,5), conteniendo KCl 0,3 M y EDTA 0,1 mM (Filippova *et al.*, 1984). Se calcularon las unidades enzimáticas internacionales de los geles inmovilizados con cada sustrato mediante curvas de calibración de soluciones de *p*-nitroanilina en las condiciones de cada ensayo. La *p*-nitroanilina liberada se determinó espectrofotométricamente por absorción a 410 nm (Morcelle *et al.*, 2006).

1.3. Inmovilización sobre gel de agarosa

El soporte utilizado para la inmovilización del EC de *A. hortorum* fue agarosa 10 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado con grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoácidos de la enzima, utilizando el protocolo de activación de Guisán *et al.*, (1997). Se preparó una solución de agarosa de 180 ml (conteniendo 105 ml de agarosa) a la cual se le adicionó bajo agitación una solución conteniendo 3,4 g de NaOH y 1,425 g de NaBH₄ y luego se agregaron gota a gota 36 ml de glicidol. Esta mezcla se dejó en agitación de paletas durante 18 h aproximadamente (en baño frío porque se trata de una reacción exotérmica). Luego se lavó el gel varias veces con agua destilada, operación que se realizó filtrando bajo vacío (en un filtro con fritas para no dañar la agarosa). De esta forma se obtuvo el gel gliceril-agarosa. Los pasos siguientes del proceso total de activación correspondieron a la oxidación del gel: a 105 g de gel activado se le adicionaron 1.410 ml de agua destilada y una mezcla conteniendo 5,136 g de NaIO₄ en 240 ml de agua destilada (100 mM). Luego se dejó oxidar suavemente con agitación de paletas durante 2,5-3 h a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el gel glioxil-

agarosa con abundante agua destilada, de igual forma a la descrita previamente.

La inmovilización se realizó a 25° C, pH 10, con bicarbonato de sodio 100 mM, glicerina al 25% (v/v), en una relación de 25 y 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml y en presencia de un inhibidor reversible. En el proceso de inmovilización el uso de un inhibidor reversible se justifica debido a que tiene un efecto de protección durante estos procesos de multi-interacción. Por el contrario, en ausencia de inhibidor las enzimas insolubilizadas pierden un importante, pero no dramático, porcentaje de actividad catalítica (Obregón *et al.* 2001). Se tomaron 2 ml de muestra 2 min antes de que finalice el tiempo de inmovilización, es decir, a las 2h y 58 min de tiempo de contacto. Finalmente, se determinó la actividad enzimática inmovilizada (EI), la actividad de la enzima soluble en el sobrenadante de inmovilización (EL) y se calculó el rendimiento de inmovilización (R).

2. REACCIÓN DE SÍNTESIS CON EXTRACTOS CRUDOS LIBRES E INMOVILIZADOS COMO CATALIZADORES

2.1. Selección de los medios de reacción para las síntesis

La selección de los medios de reacción se llevó a cabo en base a la mayor estabilidad enzimática, medida como actividad caseinolítica residual (Ucas/mg de proteína). Para ello se tuvieron en cuenta los resultados de estudios previos de estabilidad del EC de *Araujia hortorum* en diferentes medios acuosos y no convencionales (Priolo *et al.*, 2000; Priolo *et al.*, 2001; Quiroga *et al.*, 2005 a,b; Barberis *et al.*, 2005).

2.2. Selección de los sustratos para las síntesis.

Para la selección de los donantes de acilo se tuvieron en cuenta las preferencias de EC de *Araujia hortorum* por los derivados N- α -carbobenzoxy *p*-nitrofenil ésteres. En cambio, la selección del nucleófilo (Phe.OMe) se realizó en base a su elevada hidrofiliidad, lo cual asegura una concentración saturante de

dicho sustrato en el entorno de la enzima, y a la baja afinidad de la enzima por dicho aminoácido, en relación a las presentadas por los donantes de acilo, en el medio acuoso.

2.3. Selección del pH y temperatura para las síntesis.

En función de estudios previos, buffer Tris-HCl (0,1 M) fue seleccionado para mantener el pH de trabajo en un valor igual a 8.5. La temperatura utilizada en todos los ensayos fue de 37° C (Priolo *et al.*, 2000).

2.4. Reacciones de síntesis.

En todos los ensayos la enzima (1mg/ml), el activador (2-mercaptoetanol) y el nucleófilo fueron disueltos en buffer, en tanto que cada donante de acilo fue disuelto en la fase orgánica. La reacción de condensación comenzó cuando ambas fases fueron puestas en contacto y transcurrió durante varias horas (0-72 h), a temperatura y agitación controladas (160 rpm). A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras de ambas fases por separado, para su posterior análisis. Se realizaron los siguientes blancos de reacción: un blanco sin enzima (para descartar la síntesis química) y un blanco de enzima sin sustratos (a fin de descartar la liberación de péptidos que pudieran confundirse con el producto deseado). Como tiempo cero se consideró el momento en que se agregó la enzima. En forma comparativa, las reacciones de síntesis se llevaron a cabo utilizando EC de *Araujia hortorum* libre e inmovilizada como catalizador (Quiroga *et al.*, 2008).

2.5. Control analítico de los componentes de las reacciones de síntesis

Los productos sintetizados y los sustratos fueron analizados por HPLC con detector UV. Dichos análisis fueron llevados a cabo utilizando un cromatógrafo Gilson (Modelo 712) equipado con una columna Luna C-18 (5μ) 250 mm x 4,60 mm (Phenomenex). El proceso cromatográfico fue realizado a temperatura ambiente (25° C) y el volumen de inyección fue de 200 μl para todas las experiencias. La velocidad de flujo fue de 0,8 ml/min. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-agua (50:50) acidificada con TFA al 0,1% (pH 3). El

material de elución fue monitoreado espectrofotométricamente a 254 nm. Para realizar la cuantificación de los productos y de los sustratos se construyeron curvas de calibración utilizando patrones comerciales.

Por otra parte los productos de las reacciones de síntesis más interesantes en cuanto a sus resultados fueron caracterizados por HPLC-MS (Agilent 1100 LC/MSD series). Las muestras disueltas en acetonitrilo (20 µl) fueron inyectadas en una columna Lichrospher 100 RP-18, 5 µm, 250 mm × 4mm (Merck). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: solvente A, 0,5% ácido acético en agua (v/v); solvente B, ácido acético 0,5% (v/v) en H₂O:CH₃CN 20:80; gradiente de elución 40-100% en 40 min; flujo, 0,8 ml/min; detección, 254 nm. La identidad de cada pico fue determinada mediante el detector de masas electrospray acoplado al HPLC (ESI MS, *electrospray ionization mass spectrometry*), modo positivo (Morcelle *et al.*, 2006).

2.6. Proceso de inmovilización

2.6.1. Determinación de la actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática fueron realizados usando PFLNA como sustrato. La actividad enzimática fue medida siguiendo el aumento de la absorbancia a 410 nm, que acompaña la liberación de p-nitroanilina. La actividad fue expresada en U_{PFLNA}/mg de proteína.

2.6.1. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Bradford.

2.6.1. Carga enzimática y rendimiento de inmovilización

Se midieron dos parámetros considerados esenciales en un proceso de inmovilización: rendimiento de inmovilización y capacidad de carga de un soporte (Illanes & Barberis, 1994).

$$R = \frac{EI}{EI + EL + EP} \times 100 = \frac{EI}{ET} \times 100$$

Donde EI = actividad de la enzima inmovilizada, EL = actividad de la enzima soluble en el sobrenadante de inmovilización, EP = actividad enzimática perdida y ET = actividad enzimática total contactada en el proceso de inmovilización.

2.6.1. Rendimiento de proteína

El rendimiento de proteínas (RP) queda expresado por la siguiente ecuación:

$$RP = \frac{PI}{PI + PL} = \frac{PI}{PT} = \frac{PT - PL}{PT}$$

Donde PI = proteína inmovilizada, PL = proteína libre y PT = proteína total.

Por su parte, la proteína inmovilizada se determinó por diferencia entre la proteína total y la libre.

2.6.1. Inmovilización de EC de *Araujia hortorum* en gel de agarosa

Debido a su elevado rendimiento en la inmovilización, conservación de actividad a lo largo de varios procesos y a su disponibilidad en el laboratorio se eligió finalmente agarosa 10 BLC (Hispanagar) previamente activada como soporte para la síntesis peptídica a ensayar. La inmovilización se realizó según lo explicado en este capítulo (*cfr.* 1.3) con el protocolo de activación de Guisán *et al.*, 1993.

2.7. Síntesis en medios orgánicos utilizando EC de *Araujia hortorum* libre como catalizador

El dipéptido de interés comercial seleccionado para la síntesis enzimática fue Z-Ala-Phe.OMe. Para la síntesis de este dipéptido en medios bifásicos se consideraron los siguientes aspectos : *a)* las preferencias de EC de *Araujia hortorum* en buffer. (Priolo *et al* 2000, 2001), *b)* el buen comportamiento de Phe.OMe como nucleófilo en reacciones de síntesis previamente estudiadas, *c)* la simplicidad estructural de dicho dipéptido, *d)* la existencia de un patrón comercial (que permite

simplificar las determinaciones analíticas por técnicas de HPLC) y *e*) el interés comercial de este producto por ser el precursor de un dipéptido amargo, de sabor a cafeína y, por ende, de utilidad en la industria alimenticia.

Las condiciones experimentales ensayadas fueron las siguientes:

Medios de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5)-hexano (50:50) buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5)-acetato de etilo (50:50)
Temperatura	37° C
Velocidad de reacción	160 rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20 mM)
Donantes de acilo	N- α -carbobenzoxy-Ala- <i>p</i> -nitrofenil éster (4 mM) N- α -carbobenzoxy-Ala.OH (4 mM)
Nucleófilo	Phe.OMe (4 mM)
Biocatalizador	EC de <i>Araujia hortorum</i> (1 mg/ml) (0,265 UI/mg de proteína) en dos formas: a) libre, en los siguientes medios: mezclas de buffer Tris-HCl (0,1 M, de pH 8,5) y hexano o acetato de etilo en relación 50:50 b) inmovilizado, en agarosa activada en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 8,5) y acetato de etilo 50:50

La selección de los sistemas bifásicos se llevó a cabo en función de las siguientes condiciones: *a*) la buena estabilidad de EC de *Araujia hortorum* en dichos medios bifásicos. (Quiroga *et al.*, 2005 a,b; Barberis *et al.*, 2006); *b*) a la mejor respuesta obtenida por parte de EC de *Araujia hortorum* en síntesis previas llevadas a cabo en medios bifásicos (dicha enzima fue incapaz de formar uniones peptídicas en medios miscibles y continuos con bajo contenido acuoso); *c*) a la elevada hidrofobicidad del producto de síntesis, lo cual permite desviar el equilibrio de la reacción hacia la síntesis por partición del producto en la fase orgánica.

La concentración del donante de acilo se calculó en base a los siguientes parámetros: *a*) la afinidad (K_m^{-1}) de la enzima por el donante de acilo; *b*) a su coeficiente de partición (*P*) el cual se define como la concentración de un componente en la fase orgánica dividida por su concentración en la fase acuosa.

De acuerdo a ello, una concentración de 4 mM fue 270 veces el valor de K_m (0,0148 mM) de EC de *Araujia hortorum* para el donante de acilo (N- α -carbobenzoxy-Ala-*p*-nitrofenil éster).

En todos los casos se ensayó la síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe OMe utilizando como sustratos Z-Ala-OH (N- α -carbobenzoxy-Ala.OH) y PheOMe.HCl bajo control cinético y N- α -carbobenzoxy-Ala-*p*-nitrofenil éster (Z-Ala-*p*No) y PheOMe.HCl bajo control termodinámico.

- Adlercreutz P. (1991) "On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity" *Eur. J. Biochem.*, **199**: 609-614.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402.
- Anderson, J.W. (1968) "Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues" *Phytochemistry*, **7**: 1973-88.
- Barberis, S., E. Quiroga, S. Morcelle, N. Priolo & J. Luco. (2006) "Study of phytoproteases stability in aqueous-organic biphasic systems using linear free energy relationships". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **38**: 95-103.
- Bradford, M. B. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Anal. Biochem.*, **72**: 248-54.
- Burkart A. (1979) Colección Científica del INTA. Tomo VI-V. Buenos Aires, Argentina.
- Dimitri, M.J. (1978) "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería" Editorial Acme SACI, Buenos Aires, pp 774-780.
- Dixon M. & E. Webb (1979) "Enzymes", 3^o edición, Academic Press, NY. pp. 164-169.
- Caffini, N. O., M.C., Arribére & N.S. Priolo (1990) "Desarrollo de un equipo sencillo para la realización simultánea de reacciones enzimáticas en sistemas de dos fases". *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **9**: 183-185.
- Clapés, P., C. Morán & M. R. Infante, (1999). "Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants". *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 333-343.
- Filippova, I.Y., E.N., Lysogorskaya, E.S. Oksenoit, G.N. Rudenskaya & V.M. Stepanov (1984). "L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide - A chromogenic substrate for thiol proteinase assay" *Anal. Biochem.*, **143**: 293-297.
- Frohman, M.A., M.K. Dush & G.R. Martin (1988) "Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002.
- Gebhard, L.G., F.U. Carrizo, A.L. Stern, N.I. Burgardt, J. Faivovich, E. Lavilla, & M.R. Ermácora (2004). "A Kazal prolyl endopeptidase inhibitor isolated from the skin of *Phyllomedusa sauvagii*", *Eur. J. Biochem.* **271**: 2117-2126.
- Good, N. E. & S. Izawa (1972) "Hydrogen ion buffers". *Meth. Enzymol.*, **24**: 53-68.
- Guisán J., Fernández-Lafuente R., Rodríguez V., Bastida A. and Alvaro G. (1993) In Stability and Stabilization of Enzymes (W. Van der Tweel, A. Harder and R. Buitelaar, eds.), Elsevier Science Publishing Company Inc., Amsterdam, pp 55-62.
- Guisán J., G. Penzol, P. Armasen, A. Bastidas, R. Blanco, Fernandez-Lafuente, & García-Junceda. (1997) "Immobilization of Enzymes on glyoxyl agarose Immobilization of Enzymes and Cells". Bickerstaff, G.F., ed., Humana Press Inc. Totowa, pp 277-287.
- Guisán, J.M. (2006) "Immobilization of enzymes and cells" Humana Press Inc. Totowa, pp 185-204.

- Gupta, M.N. & I. Roy, (2004) "Enzymes in organic media. Forms, functions and applications" *Eur. J. Biochem.*, **271**: 2575-2583.
- Hames, B. D. (1996) One-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis, en Gel electrophoresis of proteins, 2da edn. (B. D. Hames & D. Rickwood, eds.) Oxford: Oxford University Press, pp. 1-147.
- Hashimoto, F., Horigome, T., Kanbayashi, M., Yoshida, K. & Sugano, H. (1983) "An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel". *Anal. Biochem.*, **129**: 192-9.
- Highley, T.L. en: Dashek, W. V. (1997). "Methods in plant biochemistry and molecular biology" Boca Raton . FL: CRC Press, pp. 309-321.
- Illanes A. & S.E. Barberis (1994) "Catálisis enzimática en fase orgánica". In Biotecnología de Enzimas, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C., USA, Ediciones Universitarias de Valparaíso. Monografía 35. Serie Biología. pp. 225-254.
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, **227**: 680-5.
- Morcelle del Valle, S.R. (2004) "Estudio de las proteasas del látex de *Funastrum clausum* (Asclepiadaceae) para su uso en la síntesis de péptidos". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Morcelle, S.R., S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Aviles & N.S. Priolo (2004) "Funastrain c II: a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*" *Protein J.*, **23**: 205-15.
- Morcelle, S. R., S. Barberis, N., Priolo, N.O. Caffini & P. Clapés (2006) "Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-Ome". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **41**: 117-124.
- Morcelle, S.R., S. Barberis, N. Priolo, N.O. Caffini & P. Clapés (2006). "Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe". *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **41**:117-124.
- Murachi, T. (1970). "Bromelain enzymes". *Meth. Enzymol.* **19**: 273-284.
- Nelson, N. (1944) "A photometric adaptation of the Somogy methods for the determination of glucosa" *J. Biol Chem.*, **153**: 375.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube & W. Ehrhardt (1988) "An improved procedure for staining of proteins following separation in polyacrylamide gels is described which utilizes the colloidal properties of Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250". *Electrophoresis*, **9**: 255-62.
- Obregón, W.D., M.C., Arribére, S. Morcelle del Valle, C., Liggieri, N.O. Caffini, & N.S. Priolo (2001). "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.*, **20**:17-25.
- Peterson, G.L. (1979) "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry", Rosebrough, Farr & Randall, *Anal. Biochem.*, **100**: 201-20.

- Priolo, N.S., L.M.I. López, M.C. Arribére, C.L. Natalucci & N.O. Caffini (1991) "New purified plant proteinases for the food industry" *Acta Aliment. (Budapest)*, **20**: 189-96
- Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L.M.I. López & N.O. Caffini (2000) "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits", *J. Protein Chem.* **19**: 39-48.
- Quiroga E., N. Priolo, J. Marchese & S. Barberis (2005a) "Stability of araujiain, a novel plant protease, in different organic systems" *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **24**: 204-208.
- Quiroga E., N. Priolo, J. Marchese & S. Barberis (2005b) "Behavior of Araujiain, a new cysteine phytoprotease, in organic media with low water content." *Electronic Journal of Biotechnology*, **9**: 18-25.
- Quiroga, E., D. Obregón, N. Priolo, J. Marchese & S. Barberis (2007) "Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (Asclepiadaceae) fruits". *Biochemical Engineering Journal*. Article in Press (doi:10.1016/j.bej.2007.08.020)
- Rowan, A.D. & D.J. Buttle (1994) "Pineapple Cysteine Endopeptidases". *Meth. Enzymol.* **244**: 555-568.
- Salvesen, G. & H. Nagase (2001) Inhibition of proteolytic enzymes, en *Proteolytic enzymes, a practical approach*, 2^a. Ed., Oxford University Press, Oxford, pp. 105-30.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schägger H & von Jagow G. (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD". *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Silverstein RM. (1974). "The assay of the bromelains using N-CBZ-L-lysine p-nitrophenyl ester and N-CBZ-L-glicine p-nitrophenyl ester as substrates". *Analytical Biochem.*, **62**: 478-484.
- Somogy, M. (1952). "Notes on sugar determination" *J. Biol Chem*, **195**: 19
- Sprensen, S.B., T.L. Sprensen & K. Breddam (1991) "Fragmentation of proteins by *S. Aureus* strain V8 protease. Ammonium bicarbonate strongly inhibits the enzyme but does not improve the selectivity for glutamic acid" *FEBS Lett.* **294**:195-197
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, & T.J. Gibson (1994) "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-80.
- Trejo, S.A. (2005) "Purificación, caracterización bioquímica y estructural y expresión de una endopeptidasa cisteínica de látex de *Asclepios fruticosa* L. (*Apocynaceae*)", Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Westergaard, J.L., C. Hackbarth, M.W. Treuhaft & R.C. Roberts (1980) "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures" *J. Immul. Meth.*, **34**: 167-75.



RESULTADOS & DISCUSIÓN

Extractos Crudos

EXTRACTOS CRUDOS

Características generales

El contenido de proteínas del extracto crudo obtenido a partir del látex de los frutos de *Araujia angustifolia* fue de 1,5 mg/ml y de 5,4 mg/ml para el de *Araujia hortorum*.

Empleando las técnicas mencionadas en Materiales y Métodos se pudieron detectar varias actividades hidrolíticas en los extractos crudos estudiados. Ambos extractos mostraron actividad proteásica, amidásica, esterásica, poligalacturonidásica y pectinmetilesterásica. Con los métodos empleados no exhibieron actividades ramnogalacturonidásica, xilanásica, metilcelulásica y carboxipeptidásica.

La principal actividad catalítica observada fue la proteolítica. Para conocer el intervalo de tiempo en que se mantenía una correlación lineal entre velocidad de reacción y tiempo se realizaron estudios de las velocidades iniciales, utilizando caseína como sustrato. Se observó que hasta los 5 min de reacción existía una elevada correlación.

Los incrementos en las concentraciones de cisteína agregada a la mezcla de reacción aumentaron la actividad proteolítica de los extractos, lográndose la máxima actividad en presencia de cisteína 12 mM. Mediante el agregado de este activador se obtuvieron valores de actividad enzimática de hasta 4 veces superiores. Se debe tener en cuenta que los extractos originales se prepararon en buffer conteniendo cisteína 5 mM, para lograr un ambiente reductor o protector en el medio y evitar la oxidación de cualquier componente estructural de la enzima. De esta manera, el agregado de cisteína tiene un doble efecto: a bajas concentraciones logra un ambiente protector y a elevadas concentraciones produce un aumento de la eficiencia catalítica. Los resultados obtenidos con el agregado de cisteína constituyen un indicio de que estas proteasas deben ser del tipo cisteínicas. Resultados similares fueron obtenidos en presencia de DTT y β mercaptoetanol.

El buffer de extracción también contuvo EDTA 5 mM, componente que se agrega corrientemente a los buffers utilizados para probar actividad proteolítica sobre caseína de extractos crudos o parcialmente purificados. La función del EDTA es secuestrar metales que puedan presentes en los extractos vegetales que aún no han podido ser removidos y que pueden interferir en la actividad de estas peptidasas. Los metales pesados pueden inhibir a las endopeptidasas cisteínicas por formación de mercáptidos (Storey & Wagner, 1986).

La actividad proteolítica disminuyó en un 95% para ambas muestras cuando se agregaron iodoacetato o E-64 (inhibidores típicos de proteasas cisteínicas) luego de 15 min de incubación. Se demostró que la inhibición fue irreversible, pues la adición de cisteína no fue capaz de revertirla, tanto si se adiciona en el momento de iniciar la incubación con el ácido iodoacético o con el E 64, como después de 30 min de incubación (Fig. 1).

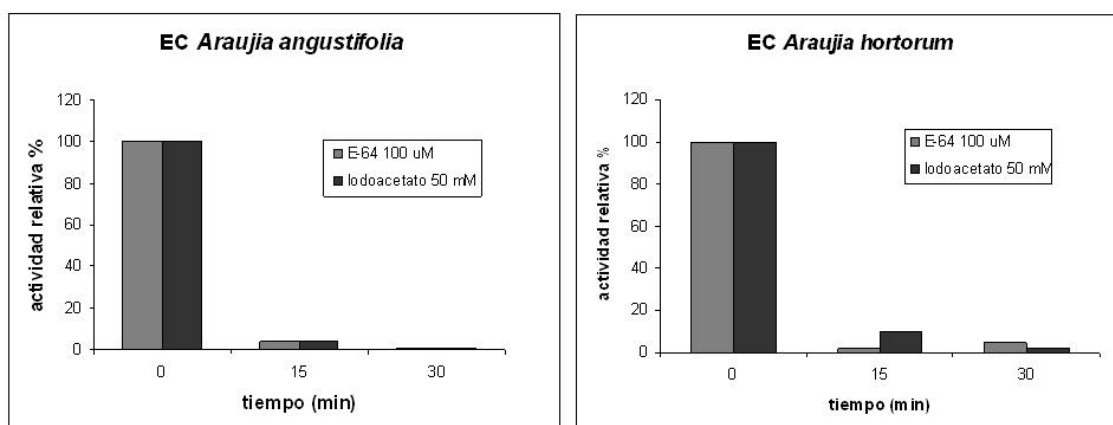


Figura 1. Inhibición de los EC de *Araujia angustifolia* y *A. hortorum* empleando inhibidores específicos de proteasas cisteínicas

Los análisis de inactivación con HgCl_2 , inhibidor reversible de endopeptidasas cisteínicas por formación de mercáptidos, confirmaron la naturaleza cisteínica de las proteasas presentes en los extractos crudos. En presencia de este inhibidor se produce una inhibición total con todas las concentraciones ensayadas, que resultó revertida por el agregado de cisteína

luego de 30 min de incubación frente al inhibidor. Si se adiciona cisteína previamente al agregado del inhibidor la inhibición no tiene lugar.

En consecuencia, la activación por parte de la cisteína y los resultados de inhibición indican una dependencia de la actividad de la/s enzimas de la presencia de los grupos SH- en el sitio activo. Esta conducta se demostró previamente para otras proteasas de la familia *Asclepiadaceae* (Lynn *et al.*, 1980a; Abraham & Joshi, 1979b; Tablero *et al.*, 1991, Arribére *et al.*, 1998, Arribére *et al.*, 1999).

Puesto que el mecanismo catalítico de las peptidasas cisteínicas utiliza cisteína como donador de protones, es característica la activación catalítica por tioles de bajo peso molecular (Storey & Wagner, 1986; Beynon & Bond, 2001; Barrett *et al.*, 1982). La activación puede ser lenta, pero el incremento de la actividad proteolítica de ambos extractos causado por estos agentes reductores es realmente notable. El ditiotreitól (DTT), el β - mercaptoetanol y la cisteína son agentes que han sido utilizados a lo largo de este estudio para obtener un incremento de la actividad proteolítica y que utilizados en concentraciones saturantes de 12,5 mM han logrado aumentar notoriamente la actividad enzimática. Debe destacarse que Storey & Wagner (1986) reportan que estos compuestos tiólicos pueden ejercer un efecto desestabilizador a altas concentraciones (mayores a 5 mM), hecho que Sluyterman & Wijdenes (1972) asocian con un incremento de la autólisis o autodigestión enzimática. Para evitar este efecto es necesario trabajar a bajas temperaturas durante la extracción, aislamiento y purificación de las muestras.

La Fig. 2 muestra el perfil electroforético de los extractos crudos de *A. angustifolia* y *A. hortorum* con y sin inhibidor (iodoacetato de sodio). Se observa que el tratamiento de las muestras influye en los resultados obtenidos. El calentamiento de las muestras en presencia de β -mercaptoetanol genera productos de degradación provocados por la actividad enzimática en el medio reductor cuando los extractos crudos no son inhibidos previamente. Por esta razón las muestras fueron inhibidas antes de la realización de las electroforesis (SDS PAGE).

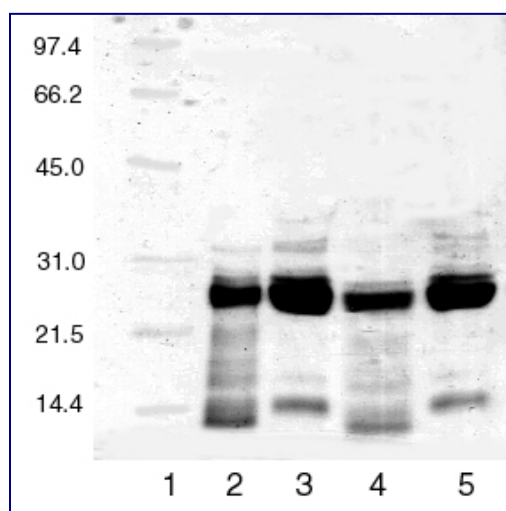


Figura 2. SDS-PAGE de los Extractos Crudos. Calle 1: Marcadores de peso molecular (Bio Rad): Fosforilasa b (97,4 kD), Seroalbúmina bovina (66,2 kD), Ovalbúmina (45,0 kD), Anhidrasa carbónica (31,0 kD), Inhibidor de tripsina (21,5 kD) y Lisozima (14,4 kD); Calle 2: Extracto crudo de *Araujia angustifolia* sin inhibir; Calle 3: Extracto crudo de *Araujia angustifolia* inhibida; Calle 4: Extracto crudo de *Araujia hortorum* sin inhibir; Calle 5: Extracto crudo de *Araujia hortorum* inhibida,

Cuando se examinó la actividad peptidásica de ambas preparaciones crudas en función del pH (Fig. 3), la de *Araujia angustifolia* mostró la máxima actividad (superior al 95%) entre pH 6,7 y 8,5, en tanto que la de *Araujia hortorum* lo hizo a valores de pH ligeramente mayores (7,5-8,5).

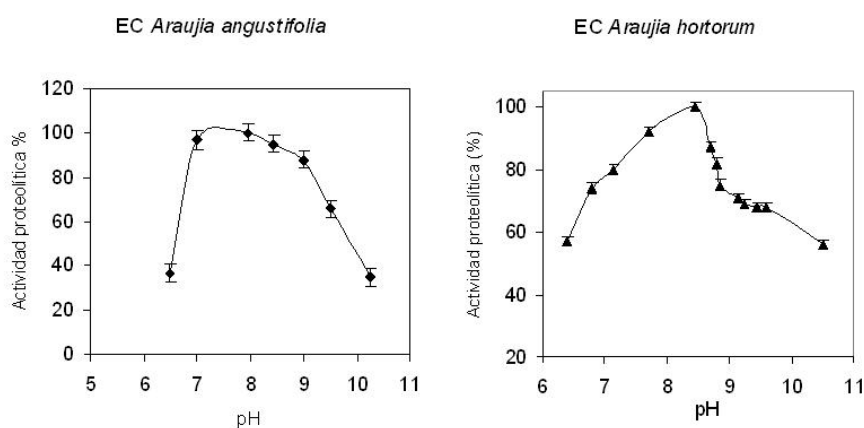


Figura 3. pH óptimo de los extractos crudos.

Este comportamiento es característico de las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1, que exhiben perfiles de actividad en función del pH relativamente amplios y un valor de pH óptimo cercano al pH neutro frente a sustratos sintéticos y proteicos (Rowan & Buttle, 1994; Barrett *et al.* 2004).

El efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de los extractos crudos fue ensayado en ausencia (estabilidad) y presencia (efecto térmico) de sustrato.

Los resultados de estabilidad térmica se muestran en la Fig. 4

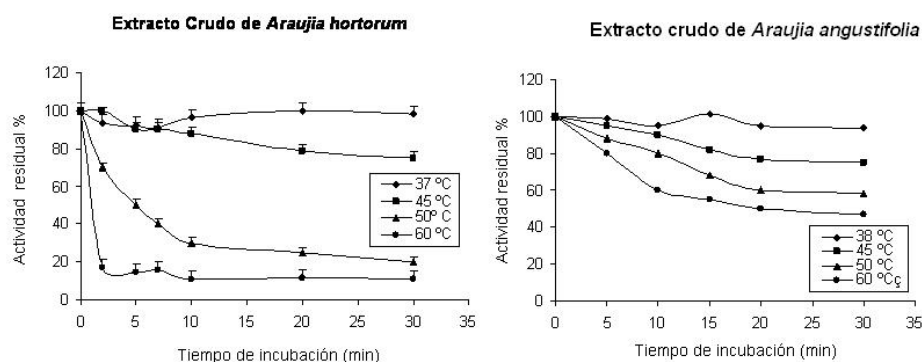


Figura 4. Estabilidad térmica de los extractos crudos.

Los dos extractivos mostraron una buena estabilidad térmica, perdiéndose sólo alrededor de un 20% de la actividad inicial luego de 30 minutos de incubación a 45° C en ambos casos. Sin embargo, el EC de *A. angustifolia* resulta más estable aún a elevadas temperaturas, manteniendo hasta un 50% de la actividad inicial luego de 30 minutos de incubación a 50°C y 60°C.

Los resultados del efecto térmico se muestran en la Fig. 5

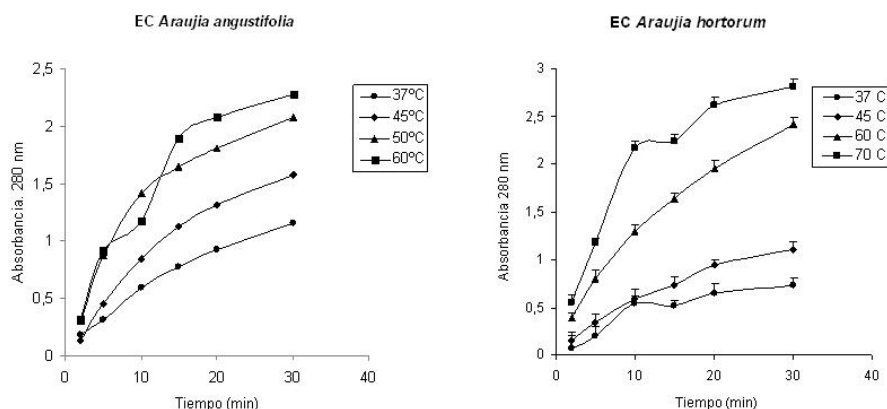


Figura 5. Efecto de la temperatura sobre los EC en presencia de sustratos.

En presencia de un sustrato como caseína, la actividad enzimática aumenta en función del tiempo con la temperatura, llegando a un máximo de actividad en ambos extractos a los 60°C. Por encima de dichas temperaturas, entre los 70°C y 80°C, ambos extractos pierden rápidamente su actividad caseinolítica, posiblemente debido a un proceso de desnaturalización proteica y no debido a autólisis. Este comportamiento con la temperatura en presencia y ausencia de sustrato indicaría un rol protector por parte del sustrato.

La elevada actividad a temperaturas relativamente altas es otra característica común a las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1 (Rowan & Buttle 1994, Barrett *et al.* 2004). Esto favorece el empleo de estos extractivos en procesos que necesitan realizarse a elevadas temperaturas, lo que constituye una propiedad útil adicional a su considerable actividad proteolítica y a la abundancia natural del material vegetal del que provienen.

La actividad de los extractos también se ensayó sobre sustratos sintéticos. En primer término se utilizó PFLNA, un sustrato cromogénico conveniente para ensayar endopeptidasas cisteínicas del tipo de la papaína, que es hidrolizado liberando *p*-nitroanilina, estimada espectrofotométricamente a 410 nm. El residuo fenilalanina en posición S₂ del PFLNA posee los requisitos de especificidad de muchas tiol-proteinasas.

En segundo término se probó la actividad endoesterolítica de los extractos crudos frente a N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los aminoácidos más comúnmente empleados para este tipo de peptidasas, tales como los derivados de glutamina, alanina y ácido aspártico. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2, donde puede observarse que ambos extractos son activos frente a dichos sustratos.

Extracto crudo	Actividad proteásica (U _{CAS})	Actividad amidásica (U _{PFLNA})	Actividad esterásica (U _{CBZ})		
			Gln	Ala	Asp
<i>Araujia angustifolia</i>	27,5	31,63	33,9	15,5	9,55
<i>Araujia hortorum</i>	34,0	38,78	53,31	2,67	24,95

Tabla 2. Actividad proteásica, amidásica, esterásica de los extractos crudos

Cuando los extractos fueron analizados por isoelectroenfoque seguido de zimograma (Fig. 6), exhibieron varios componentes dentro del rango de pI alcalino, la mayoría de ellos proteolíticamente activos. Los valores de pI obtenidos para los EC de *A. angustifolia* y *A. hortorum* fueron del orden de 8,5, 8,9 y superior a 9,3. Esta naturaleza básica también se observó en las proteasas aisladas del látex de *Asclepias glaucescens* y en las de *Morrenia brachystephana* (Arribére *et al.*, 1998; Vairo Cavalli *et al.*, 2001; Vairo Cavalli *et al.*, 2003, *Morrenia odorata* (Arribére *et al.*, 1999; Vairo Cavalli *et al.*, 2001), *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001), *Araujia angustifolia* (Obregón *et al.*, 2006), *Asclepias fruticosa* (Trejo *et al.*, 2001), *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.*, 2004a y b), *Asclepias curassavica* (Liggieri *et al.*, 2004) y *Philibertia gilliessi* (Sequeiros *et al.*, 2005)

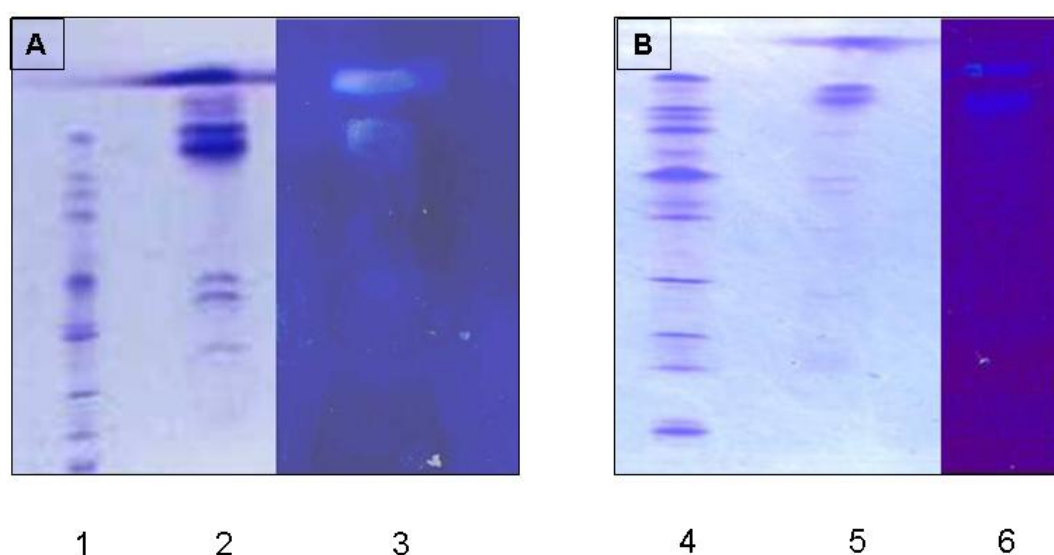
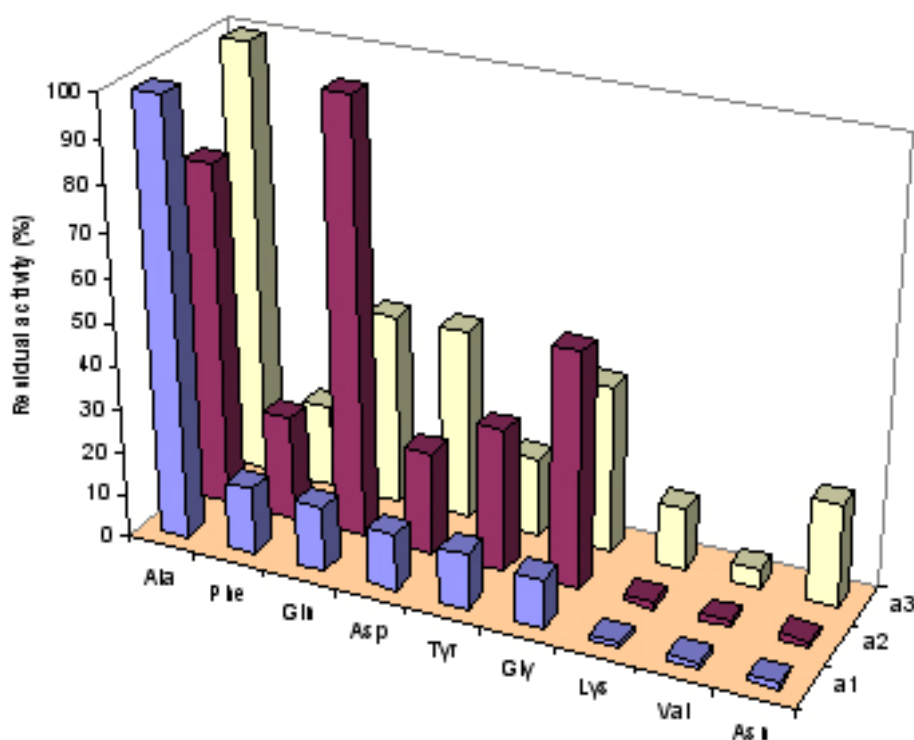


Figura 6. IEF-Zimograma de Extractos crudos. A) *Araujia angustifolia*. B) *Araujia hortorum*. Calles 1 y 4: patrones de IEF; calles 2 y 5: EC; calles 3 y 6: zimogramas.

En base de estos resultados, en ambos casos se seleccionó la cromatografía de intercambio catiónico como estrategia de purificación para las proteasas presentes en los extractos crudos.



RESULTADOS & DISCUSIÓN

*Purificación del Extracto Crudo
de Araujia angustifolia*

PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO OBTENIDO A PARTIR DEL LÁTEX DE *ARAUJIA ANGUSTIFOLIA*

El extracto crudo (EC) fue sometido a un proceso de purificación cromatográfica (FPLC), utilizando como intercambiador catiónico SP-Sepharose en buffer tris HCl 55 mM, de pH 7,4 y para la elución un gradiente lineal de NaCl (0-0,5 M). Se obtuvieron dos fracciones no retenidas sin actividad proteolítica pero con muy buena actividad pectilmetilesterásica y seis fracciones retenidas, de las cuales tres mostraron actividad proteolítica, correspondientes a los picos aI, aII y aIII (Fig. 1).

Las fracciones proteolíticamente activas se denominaron araujaína aI, aII y aIII, respectivamente, de acuerdo a la nomenclatura propuesta para nuevas proteasas vegetales (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991).

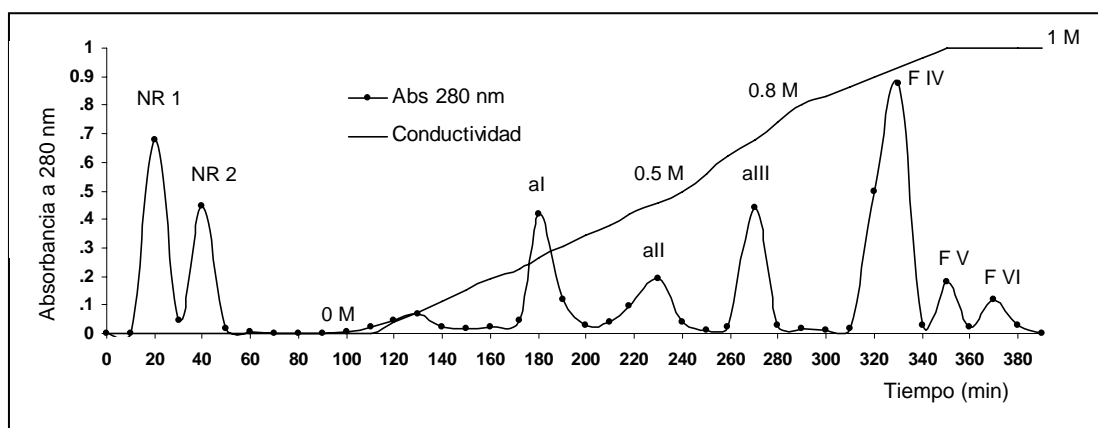


Figura 1. Cromatografía de intercambio catiónico (SP-Sepharose Fast Flow) del extracto crudo de *Araujia angustifolia* realizada en un sistema FPLC. Gradiente discontinuo de NaCl (0,0-0,5 M, 0,5-0,8 M y 0,8-1,0 M). Velocidad de flujo 0,5 mL/min. Se recogieron fracciones de 2 mL.

Además de actividad proteolítica, estas enzimas exhibieron actividad amidolítica y esterolítica. Las fracciones FIV-FVI probablemente son péptidos, ya que dieron positivo el ensayo del Biuret pero negativo el de Bradford. Por otra parte, las fracciones NR1 y NR2 muestran un bajo contenido de proteínas

(Bradford), por lo cual quizás también contenga una apreciable cantidad de pequeños péptidos.

Como se consigna en el esquema de purificación (Tabla 1), araujaína aII y araujaína aIII exhibieron los mayores valores de actividad específica, siendo araujaína aIII la de mayor rendimiento.

Muestra	Vol (ml)	Contenido en proteínas mg/ml	Proteína total (mg)	Actividad Caseinolítica Ucas/ml	Ucas totales	Actividad específica (Ucas /mg)	purificación (veces)	rendimiento (%)
EC	2	2,233	4,466	8,52	17,04	0,0038		
Araujaína a I	6	0,098	0,587	0,19	1,14	0,0019	0,5	13
Araujaína a II	5	0,055	0,277	0,17	0,85	0,0031	0,82	6,2
Araujaína a III	8	0,176	0,141	0,49	3,92	0,0027	0,71	31,2

Tabla 1. Esquema de purificación del extracto crudo de *Araujia angustifolia*.

La homogeneidad de araujaína aI, aII y aIII fue analizada por electroforesis en gel en gradiente de poliacrilamida, y posterior revelado por tinción con plata (Fig. 2). Las fracciones activas obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico (inhibidas y no inhibidas con iodoacetato de sodio) fueron sometidas a una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en gradiente (14-20 %) para amplificar la resolución. Se utilizó un equipo Miniprotean III (Bio-Rad) con un amperaje de 30 mA para el stacking y 150 mA para el desarrollo de la corrida. El gel fue teñido con Coomassie brilliant blue R-250 y posteriormente con Plata, comprobándose la homogeneidad de las fracciones purificadas. Se observó que la ausencia de inhibidor no genera autodigestión de las mismas.

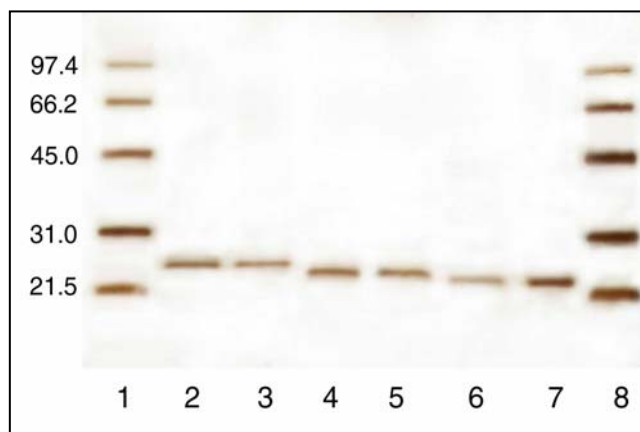


Figura 2. SDS-PAGE en gradiente de araujiaina aI, aII y aIII, en presencia y ausencia de inhibidor. Calles 1 y 8: Marcadores de peso molecular (Bio Rad): Fosforilasa b (97,4 kD), Seroalbúmina bovina (66,2 kD), Ovalbúmina (45,0 kD), Anhidrasa carbónica (31,0 kD), Inhibidor de tripsina (21,5 kD) y Lisozima (14,4 kD); Calles 2, 4 y 6: araujiainas aI, aII y aIII, respectivamente, inhibidas con iodoacetato; Calles 3, 5 y 7: araujiainas aI, aII y aIII, respectivamente, sin agregado de inhibidor.

En función de estos resultados, el peso molecular de araujiaina aI, aII y aIII se estimó en 23 kD, 21 y 23 kD; valores que son del mismo orden que los obtenidos para otras proteasas de *Asclepiadaceae*. Como las proteasas de *Asclepias syriaca* (Brockmank & Lynn, 1979; Lynn *et al.*, 1980), *Asclepias glaucescens* (Barragán *et al.*, 1985; Tablero *et al.*, 1991), las cuatro calotropinas aisladas a partir del látex de *Calotropis gigantea* (Abraham & Joshi, 1979a, 1979b; Pal & Sinha, 1980), las dos proteasas aisladas a partir de *Morrenia brachystephana* (Arribére *et al.*, 1998), las proteasas de *Morrenia odorata* (Arribére *et al.*, 1999), la proteasa de *Asclepias fruticosa* (Trejo *et al.*, 2001) y la proteasa aislada a partir del látex de *Philibertia gilliessi* (Sequeiros *et al.*, 2005)

Las masas moleculares de las enzimas purificadas se determinaron luego con más exactitud utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF), que arrojó valores de 23465 D para araujiaina aI; 23528 D para araujiain aII y 23489 D para araujiaina aIII, confirmando los datos electroforéticos previos (Fig. 3).

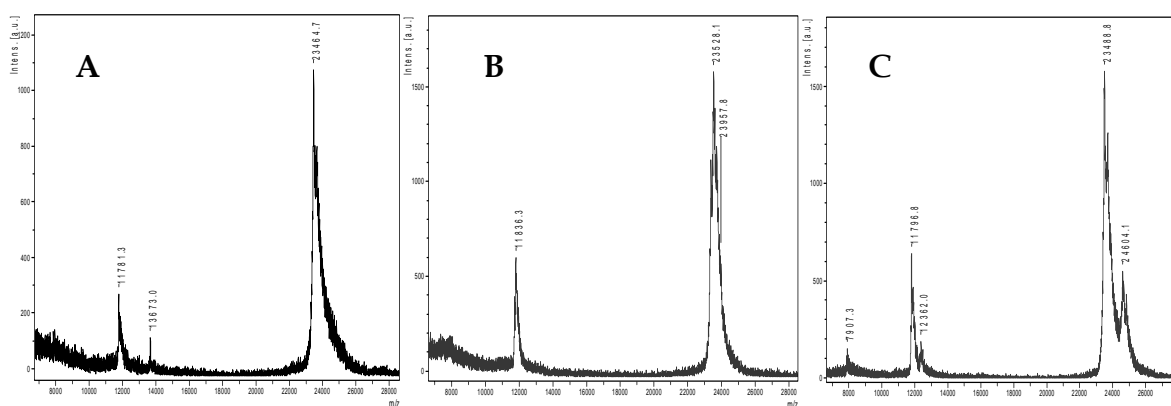


Figura 3. Espectrometría de masas (MALDI-TOF) de araujiaina aI (A), aII (B) y aIII (C).

A continuación se estudió el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las enzimas purificadas. El rango de pH óptimo para araujiaina aI y aII fue bastante estricto, entre 9 y 9,5 y entre 8 y 8,5, respectivamente, mientras que para araujiaina aIII el rango de pH óptimo fue más amplio, entre 7 y 9,5 (Fig. 4).

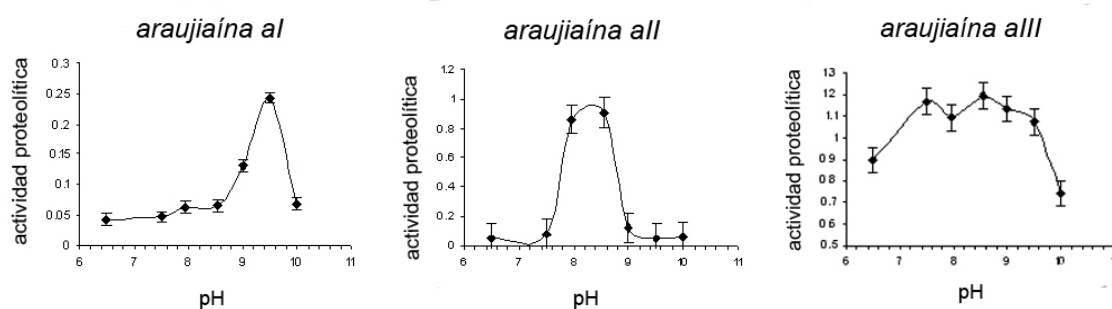


Figura 4. Perfil de pH de araujiaina aI, aII y aIII.

Teniendo en cuenta los resultados observados en el perfil de pH del extracto crudo (pH óptimo 6,7-8,5), puede inferirse que las araujiainas aII y aIII son las enzimas que prevalecen y que más aportan en la actividad proteolítica de la preparación enzimática cruda.

La acción de diversos inhibidores de proteasas cisteínicas (iodoacetato de sodio 50 mM, idoacetamida 50 mM y E64 100 μ M) produjo una inhibición total e irreversible sobre la actividad enzimática en todos los casos.

Determinación de parámetros cinéticos usando PFLNA como sustrato.

Se utilizó una solución 1 mM del sustrato L-piroglutamil-L-fenilalanina-L-leucina-*p*-nitroanilida (PFLNA) en buffer fosfatos 0,1M de pH 6,5 con KCl 0,3 M, EDTA 10⁻⁴ M y DTT 0,003 M a 37 °C. La actividad enzimática se expresó en unidades PFLNA, definidas como la cantidad en micromoles de enzima que libera un micromol de *p*-nitroanilina por minuto en las condiciones del ensayo. Los parámetros cinéticos para araujaína aII y aIII fueron calculados por un análisis de regresión lineal utilizando las ecuaciones de Hanes y de Hofstee, derivaciones matemáticas de la ecuación de Michaelis Menten, observándose un comportamiento michaeliano. En las condiciones del ensayo no se detectó actividad sobre PFLNA en el caso de araujaína aI. Como puede observarse en la tabla 2, el valor de Km para araujaína a II (0,18 mM) es más bajo que el que se obtuvo para papaína (0,34 mM), bromelina (0,30 mM) y ficina (0,43 mM) (Filippova *et al.*, 1983). Sin embargo, el Km calculado para araujaína aIII (5,14 mM) es mucho más alto que los ya mencionados, demostrando una afinidad más baja para este sustrato. La relación kcat/Km a su vez fue más alta para araujaína aII (5,99 seg⁻¹ mM⁻¹) que para araujaína aIII (2,38 seg⁻¹ mM⁻¹), dato aún más significativo de la mayor eficiencia de araujaína aII sobre este sustrato.

	Km (mM)	V _{máx} mM/seg)	Kcat seg ⁻¹	V _{máx} /km seg ⁻¹	kcat/km seg ⁻¹ mM ⁻¹
Araujaína aII	0,18	9,3×10 ⁻⁵	1,078	5,188×10 ⁻⁴	5,99
Araujaína aIII	5,14	1,86×10 ⁻³	12,260	3,619 ×10 ⁻⁴	2,38

Tabla 2. Determinación de parámetros cinéticos usando PFLNA

Los resultados de la determinación de actividad esterolítica utilizando sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster para cada una de las enzimas purificadas se muestra en la Fig. 5. Araujaína aI mostró una gran preferencia por el derivado de Ala, seguida por Phe, Gln, Asp, Tyr y Gly, que fueron hidrolizados en mucho menor grado. En el caso de araujaína aII, los derivados

de Gln y Ala fueron los preferidos, seguidos por los de Gly, Tyr, Phe y Asp, con menor velocidad de hidrólisis que los derivados anteriores. En el caso de araujaína aIII, al igual que en araujaína aI, la enzima mostró mayor preferencia por el derivado de Ala, seguido en menor medida por los correspondientes a Gln, Asp, Gly, Asn, Phe y Tyr.

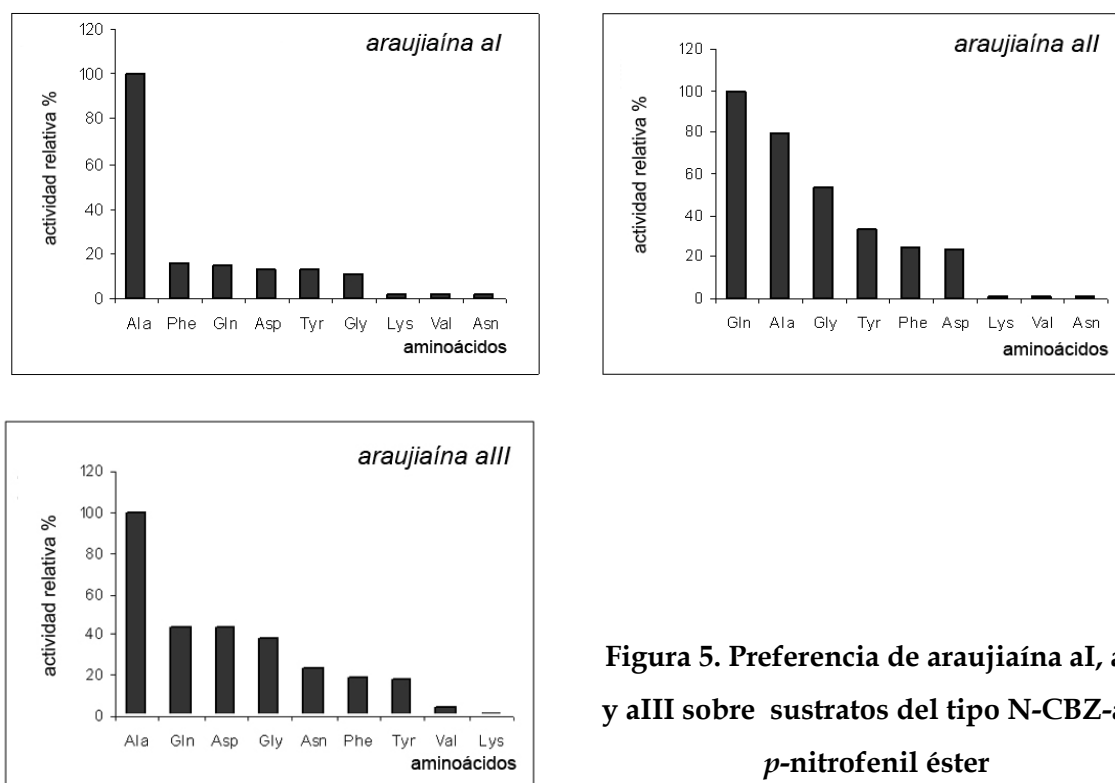


Figura 5. Preferencia de araujaína aI, aII y aIII sobre sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster

Como consecuencia del comportamiento de las tres enzimas frente a sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster pudo apreciarse que araujaína aI y aIII demostraron tener mayor afinidad por el derivado de Ala, comportamiento que también fue observado para otras peptidasas cisteínicas purificadas a partir de látex de especies que pertenecen a la familia de *Asclepiadaceae*. La actividad demostrada por araujaína aII fue significativamente diferente, ya que hidroliza al derivado de Gln con mayor preferencia que el de Ala, hecho que podría explicar la mayor afinidad del EC sobre este sustrato, sobre el que la actividad de araujaína aII es sensiblemente mayor. Finalmente, la notoria preferencia de araujaína aI por el derivado de Ala en relación al resto

de los derivados de aminoácidos ensayados justificaría la baja actividad caseinolítica de esta enzima, hecho reafirmado por su casi nula actividad sobre PFLNA. El alto grado de especificidad demostrado por araujaína aI podría constituir una ventaja para procesos biotecnológicos que requieran alta especificidad de clivaje.

Los derivados de mayor afinidad fueron elegidos para calcular las constantes cinéticas (Ala para araujaína aI y aIII y Gln para araujaína aII), pero a diferencia de lo que sucede con PFLNA, no mostraron un comportamiento michaeliano, sino que las curvas fueron sigmoideas, pareciendo comportarse de manera alostérica frente a estos sustratos.

Análisis de la secuencia N-terminal.

La comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI, aII y aIII con la de otras proteasas se muestra en las tablas 3, 4 y 5, respectivamente. Las tres enzimas muestran alta semejanza con proteasas cisteínicas de plantas en general y especialmente con las que pertenecen a especies del género *Asclepias*. Un importante porcentaje de identidad fue encontrado con las peptidasas cisteínicas de *Caricaceae* (caricaína y cisteínproteína CC-III mostraron un 86% y 85% de identidad con araujaína aI y un 73% y 72% con araujaína a II, mientras que caricaína y papaína mostraron un 83% and 79% de identidad con araujaína a III. Cabe destacar que papaína, considerada como la enzima arquetipo de las peptidasas cisteínicas, muestra un alto grado de identidad con araujaína a I, a aII y a aIII : 81%, a 69% y 79% respectivamente (Tabla 7).

Los motivos conservados DWR, QG, K, V, P son claramente distinguibles para los tres proteínas aisladas del látex de *A. angustifolia*.; estos motivos o dominios se comparten con papaína (como puede verse en las secuencias N terminales, tabla 6), y con muchas otras endopeptidasas del tipo de la papaína.

El aminoácido Pro en la posición 2 del N-terminal (residuo Pro2 en la numeración de papaína) se encuentra frecuentemente conservado en la mayoría de las peptidasas maduras de la familia C1, y se sugiere que éste previene el ataque de otras enzimas, especialmente aminopeptidasas, puesto que el enlace

Xaa – Pro X resulta inaccesible para este tipo de enzimas, formando una unión resistente que previene la hidrólisis o proteólisis del extremo amino. Esto fue observado también en gran cantidad de proteasas de la familia *Bromeliaceae* (Carter *et al.*, 2000).

Proteasa/ Fuente vegetal	Secuencia N-Terminal	Identidad	Positivos
Araujiaína aI <i>Araujia angustifolia</i>	1 VPDSIDWREKDAVLPIRNQGQC 22		
cisteínproteasa tipo RD21A <i>Triticum aestivum</i>	2 LPESIDWREKGAVAPVKNQGQC 23 +P+SIDWREK AV P++NQGQC	16/22 (72%)	20/22 (90%)
cisteínproteína GP-I <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWREKGAVVPVKNQGGC 24 +PDSIDWREK AV+P++NQG C	16/22 (72%)	20/22 (90%)
cisteínproteína GP-II <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWRENGAVVPVKNQGGC 24 +PDSIDWRE AV+P++NQG C	15/22 (68%)	19/22 (86%)
cisteínproteína CC III <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i>	2 PESIDWRKKGAVTPVKNQGS C 22 P+SIDWR+K AV P++NQG C	14/21 (66%)	18/21 (85%)
quimopapaína <i>Carica papaya</i>	2 PQSIDWRAKGAVTPVKNQGAC 22 P SIDWR K AV P++NQG C	14/21 (66%)	16/21 (76%)
papaína <i>Carica papaya</i>	1 IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGS C 22 +P+ +DWR+K AV P++NQG C	12/22 (54%)	18/22 (81%)
mexicaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWREKGAVTPVKNQNPC 22 P+SIDWREK AV P++NQ C	14/21 (66%)	17/21 (80%)
ervatamina <i>Tabernaemontana divaricata</i>	1 LPEQIDWRKKGAVTPVKNQGS C 22 +P+ IDWR+K AV P++NQG C	13/22 (59%)	18/22 (81%)
caricaína <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDWRKKGAVTPVRHQGS C 22 +P+++DWR+K AV P+R+QG C	12/22 (54%)	19/22 (86%)
quimomexicaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWRDKGAVTPVKNQNPC 22 P+SIDWR+K AV P++NQ C	13/21 (61%)	17/21 (80%)
philibertaína gI <i>Philibertia giliesii</i>	1 LPASVDWRKEGAVLPIRHQGQC 22 +P S+DWR++ AVLPIR+QGQC	15/22 (68%)	20/22 (90%)
cisteínproteína <i>Vanconcellea cundinamarcensis</i>	2 PQRMDWRKKGAVTPVKNQGGC 22 P +DWR+K AV P++NQG C	12/21 (57%)	16/21 (76%)
macrodonataína I <i>Pseudonanas macrodotes</i>	2 VPQSIDWRDYGAVNEVKNQGPC 23 VP SIDWR+ AV ++NQG C	13/22 (59%)	16/22 (72%)

Table 3. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI con la de otras proteasas.

Proteasa/ Fuente vegetal	Secuencia N-Terminal	Identidad	Positivos
araujaína aII <i>Araujia angustifolia</i>	1 LPDSVDWRDKGVVFPVRRQGGCG 23		
cisteínproteína GP-I <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWREKGAVVPVKNQGGCG 25 LPDS+DWR+KG V P + QG CG	15/23 (65%)	18/23 (78%)
cisteínproteasa tipo RD21A <i>Triticum aestivum</i>	2 LPESIDWREKGAVAPVKNQGGCG 24 LP+S+DWR+KG V P + QG+CG	14/23 (60%)	19/23 (82%)
cisteínproteína GP-II <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWREKGAVVPVKNQGGCG 25 LPDS+DWR+ G V P + QG CG	14/23 (60%)	17/23 (73%)
caricaína <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDWRKKGAVTPVRHQGGCG 23 LP++VDWR KG V P R QG CG	15/23 (65%)	17/23 (73%)
ervatamina-C <i>Tabernaemontana divaricata</i>	1 LPEQIDWRKKGAVTPVKNQGGCG 23 LP+ +DWR KG V P + QG CG	13/23 (56%)	16/23 (69%)
cisteínproteína CC-III <i>Vanconcellea cundinamarcensis</i>	2 PESIDWRKKGAVTPVKNQGGCG 23 P+S+DWR KG V P + QG CG	13/22 (59%)	16/22 (72%)
quimomexicanaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWRDKGAVTPVKNQNPCG 23 P+S+DWRDKG V P + Q CG	13/22 (59%)	16/22 (72%)
papaína <i>Carica papaya</i>	1 IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGGCG 23 +P+ VDWR KG V P + QG CG	13/23 (56%)	16/23 (69%)
quimopapaína isoforma V <i>Carica papaya</i>	2 PQSIDWRAKGAVTPVKNQGGCG 23 P S+DWR KG V P + QG CG	13/22 (59%)	15/22 (68%)
mexicanaína <i>Jacaratia mexicana</i>	2 PESIDWREKGAVTPVKNQNPCG 23 P+S+DWR+KG V P + Q CG	12/22 (54%)	16/22 (72%)
philibertaína gI <i>Philibertia giliesii</i>	1 LPASVDWRKEGAVLPVIRHQGGCG 23 LP SVDWR +G V P R QG+CG	15/23 (65%)	17/23 (73%)
cisteínproteína (s/n) <i>Vasconcellea stipulata</i>	4 SIDWRQKGAVTPVRNQGGCG 23 S+DWR KG V P R QG CG	13/20 (65%)	14/20 (70%)

Table 4. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aII con la de otras proteasas.

El aminoácido N-terminal de araujaína aI es valina, mientras que araujaína aII y aIII tienen como aminoácido N-terminal leucina. La secuencia N-terminal de araujaína aI tiene 69% de identidad con araujaína aII. La identidad entre araujaína aI y aIII es del 79%, mientras que entre aII y aIII la identidad hallada es del orden del 74%. Cuando se comparan las secuencias N-terminales de las tres enzimas en estudio se observa que presentan un 50 % de aminoácidos coincidentes, muchos de ellos están conservados en la mayoría de las proteasas cisteínicas del tipo papaína, y otros conservados en la misma familia o género.

Proteasa / Fuente vegetal	Secuencia N-Terminal	Identidad	Positivos
araujaína aIII <i>Araujia angustifolia</i>	1 LPESVDWRKKNLVFPINQGGCGS 24		
cisteínproteasa tipo RD21A <i>Triticum aestivum</i>	2 LPESIDWREKGAVAPVKNQGGCGS 25 LPES+DWR+K V P++NQGGCGS	17/24 (70%)	21/24 (87%)
cisteínproteínasa CC III <i>Vasconcellea cundinamarzensis</i>	2 PESIDWRKKGAVTPVKNQGGSCGS 24 PES+DWRKK V P++NQG CGS	16/23 (69%)	19/23 (82%)
ervatamina <i>Tabernaemontana divaricata</i>	1 LPEQIDWRKKGAVTPVKNQGGSCGS 24 LPE +DWRKK V P++NQG CGS	16/24 (66%)	19/24 (79%)
proteasa Omega <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDRKKGAVTPVRHQGGSCGS 24 LPE+VDWRKK V P+R+QG CGS	17/24 (70%)	20/24 (83%)
caricaína <i>Carica papaya</i>	1 LPENVDRKKGAVTPVRHQGGSCGS 24 LPE+VDWRKK V P+R+QG CGS	17/24 (70%)	20/24 (83%)
cisteínproteínasa GP-I <i>Zingiber officinale</i>	3 LPDSIDWREKGAVVPVKNQGGCGS 26 LP+S+DWR+K V P++NQG CGS	15/24 (62%)	20/24 (83%)
papaína <i>Carica papaya</i>	1 IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGGSCGS 24 +PE VDWR+K V P++NQG CGS	15/24 (62%)	19/24 (79%)

Tabla 5. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aIII con la de otras proteasas.

Estos resultados concuerdan y suman a otros parámetros característicos observados para este tipo de proteasas, tales como valores del pI, el pH óptimo, los patrones endoesterolíticos. Estas similitudes están de acuerdo con su función biológica, dado que las tres enzimas están situadas en el mismo compartimiento histológico, entonces debería esperarse las mismas funciones específicas para cada uno de ellas. La función más importante que se le atribuye es la de defensa y las sutiles variaciones que se observan entre ellas serían adecuadas para ejecutar una defensa efectiva contra diferentes organismos.

Las tres secuencias N-terminal fueron analizadas mediante el BLAST. El análisis demostró que las tres proteínas pertenecen al grupo de las peptidasas cisteínicas de la familia C1A, (nomenclatura de la base de datos de MEROPS). Este grupo incluye peptidasas cisteínicas de mamíferos (catepsinas B, C, F, H, L, K, O, S, V, X y W) y es representado por la papaína como la proteínasa arquetipo.

araujaína aI	1	VPDSIDWREKDAVLPIRNQGQCG	22
araujaína aII	1	LPDSVDWRDKGVVFPPIRRQGKCG	23
araujaína aIII	1	LPESVDWRKKNLVFPPIRNQGQCGS	24
papaína (<i>Carica papaya</i>)	1	IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGSCGS	24

Tabla 6. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI, aII y aIII con papaína.

El análisis del mapa peptídico (peptide mass fingerprint) de araujaína aI, aII y aIII (Fig. 6) mostró que poseen algunos picos equivalentes (Tabla 7) lo cual demuestra que son diferentes pero que comparten un alto grado de homología entre ellas. Este resultado, junto con los obtenidos mediante la metodología convencional sugieren con mayor certeza que se trataría de isoenzimas.

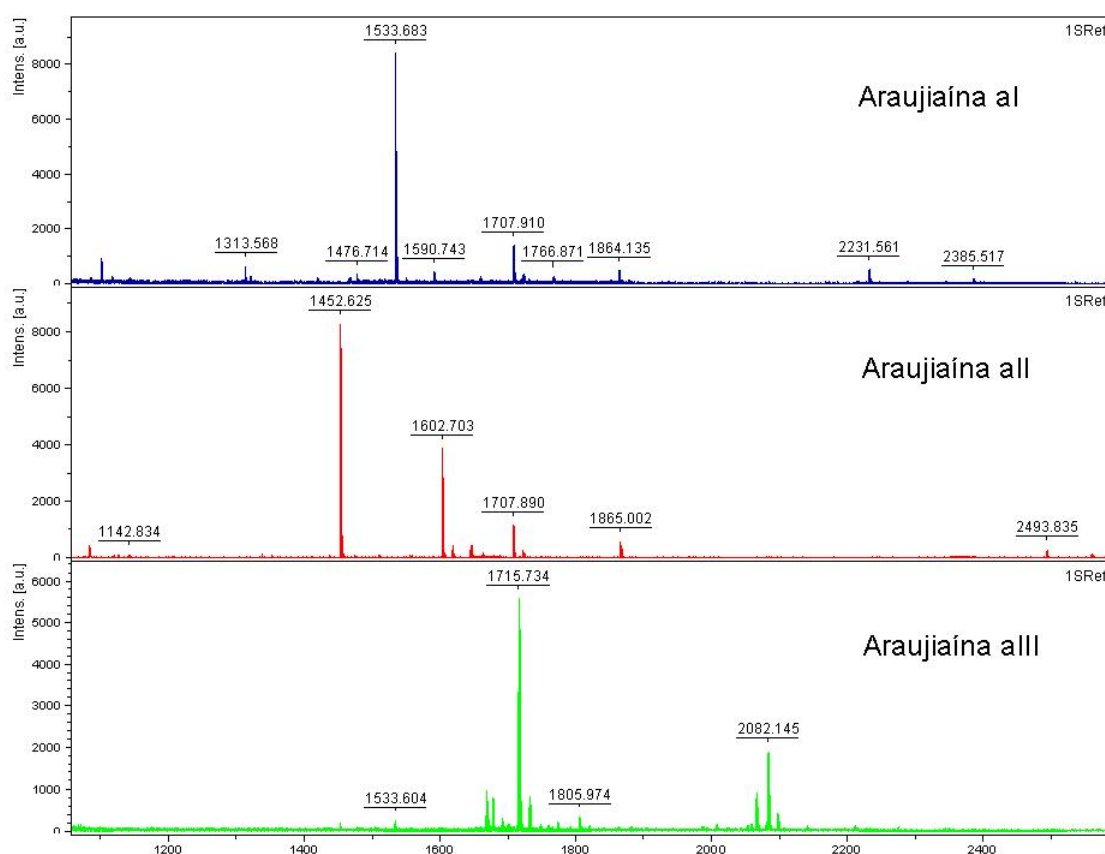


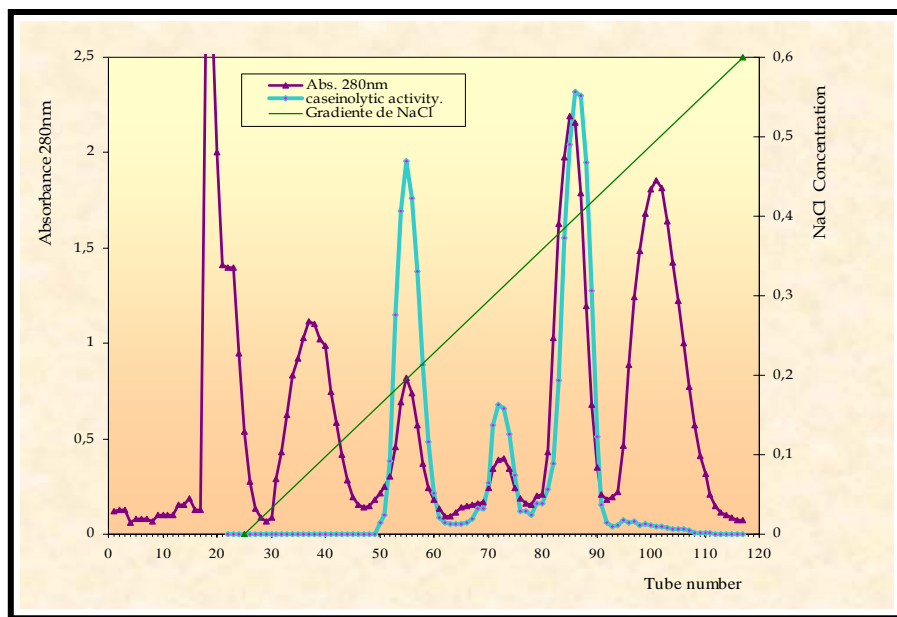
Figura 8. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF provenientes de la digestión trípica de araujaína aI, aII y aIII con papaína.

m/z(CE)	Intens.	m/z(aI)	Intens.	m/z(aII)	Intens.	m/z(aIII)	Intens.
1.083.488	1828.04	1.101.136	758.45	1.083.799	307.35	1.533.604	232.81
1.101.188	434.78	1.313.588	832.99	1.142.834	110.43	1.888.898	898.37
1.125.872	495.24	1.418.814	221.00	1.452.625	8278.00	1.677.808	798.00
1.142.726	1735.05	1.488.828	258.00	1.802.703	4180.01	1.715.734	5012.98
1.313.567	420.84	1.478.714	328.88	1.818.717	420.88	1.805.874	287.38
1.452.843	8787.81	1.533.883	8428.00	1.843.787	498.48	2.083.110	788.25
1.533.887	6638.00	1.590.743	407.41	1.707.890	1188.34	2.082.145	1818.88
1.654.888	806.24	1.658.855	238.00	1.721.811	276.21	2.086.184	330.88
1.580.746	1143.12	1.874.888	116.00	1.740.887	78.00		
1.602.723	2100.48	1.707.910	1498.17	1.865.002	458.79		
1.846.782	878.41	1.723.846	211.87	2.183.836	182.81		
1.658.894	483.20	1.788.871	215.00	2.588.844	81.52		
1.882.810	377.38	1.884.136	418.88				
1.667.800	751.88	1.878.125	128.00				
1.677.915	883.20	2.214.680	100.00				
1.707.828	1700.81	2.231.561	408.06				
1.715.851	1388.48	2.344.688	88.00				
1.751.822	388.88	2.385.517	181.00				
1.807.897	284.71	2.707.131	67.00				
1.885.860	931.85	2.718.848	88.00				
2.204.577	333.48						
2.493.935	132.37						

Tabla 7. Datos numéricos correspondientes a los mapas peptídicos (peptide mass fingerprint, PMF) de araujaína aI, aII y aIII.

La presencia de picos coincidentes entre las enzimas estudiadas refleja la presencia de dominios conservados, algunos propios de la especie y quizás muchos otros propios de la mayoría de las proteasas cisteínicas de la familia *Asclepiadaceae*, *Caricaceae* y *Bromeliaceae*. Por otra parte, la existencia de picos no coincidentes demostraría que constituyen diferentes enzimas, con la misma función biológica, pero con distinta actividad enzimática.

Utilizando los mapas trípticos realizados y empleando la herramienta MASCOT se realizaron búsquedas a fin de identificar las proteínas originales. Mediante este software no se encontraron proteínas que permitieran establecer la identidad de estas enzimas con valores aceptables, en razón de no haberse ingresado aún información sobre proteasas vegetales provenientes de especies pertenecientes a las familias *Apocynaceae* y *Asclepiadaceae*. Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron confirmar que se trata de tres enzimas diferentes. Por otra parte, este tipo de estudios podría permitir el empleo a futuro de esta herramienta fundamental de la proteómica con el objeto de detectar proteasas en extractos vegetales.



RESULTADOS & DISCUSIÓN

Purificación del Extracto Crudo de Araujia hortorum

PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO OBTENIDO A PARTIR DEL LÁTEX DE *ARAUJIA HORTORUM*

El extracto crudo (EC) fue purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico en una columna rellena con CM-Sepharose Fast-Flow utilizando un sistema FPLC y aplicando un gradiente lineal de ClNa (0-0,6M), con un flujo de 0,3 ml/min en buffer cítrico-fosfato 0,05 M de pH 6,4. Se sembraron 7,5 ml de extracto crudo conteniendo 8 mg de proteínas. Las fracciones recolectadas fueron monitoreadas a 280 nm. La cromatografía permitió resolver siete fracciones: una fracción no retenida que, a diferencia de lo que sucede con la fracción no retenida del EC de *A. angustifolia*, no posee actividad pectinmetilesterásica, tres fracciones principales con actividad proteolítica y otras tres fracciones no activas (Figura 1). Se propone para estas nuevas proteasas aisladas a partir del látex de *Araujia hortorum* los nombres de araujaína hI, hII y hIII, según lo recomendado por Barragán *et al.* (1985) y Tablero *et al.* (1991).

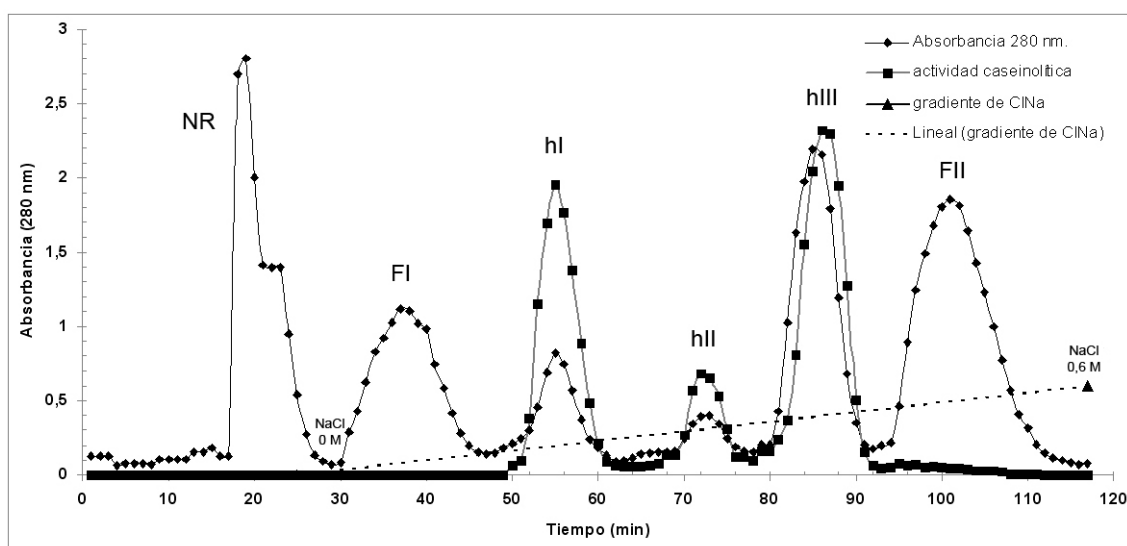


Figura 1. Cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sepharose Fast Flow) del extracto crudo de *Araujia hortorum* realizada en un sistema FPLC. Gradiente continuo de NaCl (0,0–0,6 M). Velocidad de flujo 0,25 mL/min. Se recogieron fracciones de 2 mL.

En la Tabla 1 se presenta el esquema de purificación. En la misma puede observarse que aunque araujaína hIII mostró el mayor rendimiento (16,8% de proteínas totales, 59,8% de la fracción proteolítica), araujaína hI (9,9% de proteínas totales, 34,7% de la fracción proteolítica) demostró poseer la actividad específica más alta.

Muestra	Vol (ml)	Proteínas mg/ml	Proteínas totales (mg)	Ucas ml	Ucas totales	Actividad específica	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
EC	7,5	1,067	8,00	32,63	244,73	4,08	1	100
Araujaína h I	19,0	0,066	1,25	1,28	24,32	19,40	4,8	9,9
Araujaína h II	16,5	0,041	0,68	0,28	4,55	6,73	1,7	1,9
Araujaína h III	21,0	0,185	3,89	1,96	41,16	10,59	2,6	16,8

Tabla 1. Esquema de purificación del extracto crudo de *Araujia hortorum*.

Caracterización de las tres endopeptidasas purificadas

Las fracciones proteolíticamente activas fueron analizadas por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) y posteriormente por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Todas estas fracciones resultaron ser

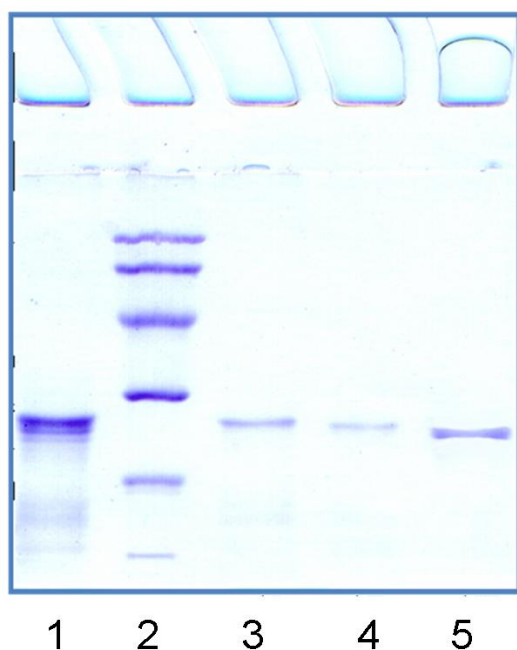


Figura 2. SDS-PAGE de araujaína hI, hII y hIII y EC. Calle 1: EC; Calle 2: Marcadores de peso molecular (Bio Rad): Fosforilasa b (97,4 kD), Seroalbúmina bovina (66,2 kD), Ovalbúmina (45,0 kD), Anhidrasa carbónica (31,0 kD), Inhibidor de tripsina (21,5 kD) y Lisozima (14,4 kD); Calles 3, 4 y 5: araujaínas hI, hII y hIII, respectivamente.

homogéneas y con masas moleculares del orden de los 23 kD, característica similar a la observada para las proteasas presentes en el látex de *Araujia angustifolia*.

La masa molecular de estas enzimas fue determinada por espectrometría de masas (Fig.3). Los resultados obtenidos fueron: 24031 D (araujiaina hI), 23718 D (araujiaina hII) y 23545 D (araujiaina hIII). Los valores obtenidos son característicos de proteasas cisteínicas de origen vegetal y casi coincidentes con los determinados para otras proteasas de *Asclepiadaceae*, tal como se mencionó para *A. angustifolia*.

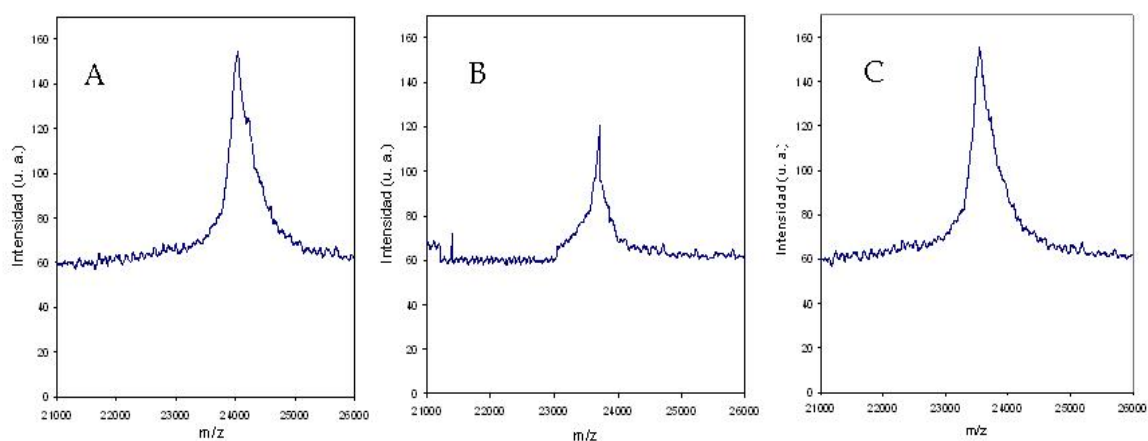


Figura 3. Espectrometría de masas (MALDI-TOF) de araujiaina hI (A), hII (B) y hIII (C).

Parámetros enzimáticos generales

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica fue estudiado como se indicó en Materiales & Métodos. La mayor actividad para las tres proteasas fue obtenida en el rango de pH alcalino (Fig.4), tal como se mostró al analizar el EC. araujiaina hI y hII muestran un mayor rango de pH óptimo (7,8 – 9,6 y 7,8 – 9,4, respectivamente) en tanto que el pH óptimo de araujiaina hIII cubre un rango sensiblemente más estrecho (8,4 – 9,1). Las determinaciones se llevaron a cabo en presencia de cisteína 12 mM. En la Fig. 4 puede apreciarse que la actividad

caseinolítica de araujiaina hI es casi veinte veces mayor que las de las otras dos proteasas.

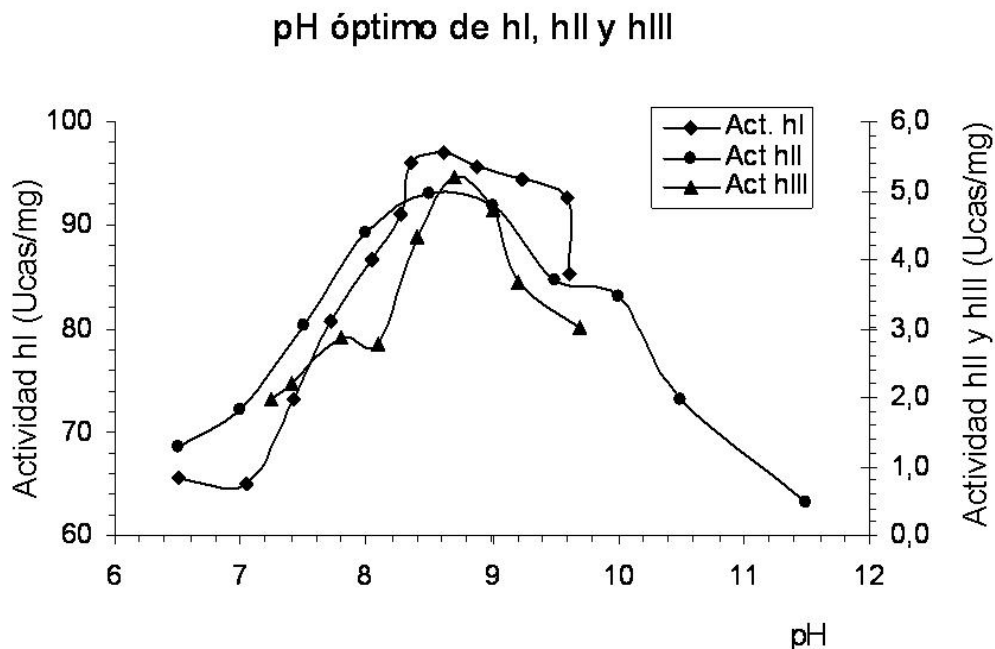


Figura 4. Perfil de pH de araujiaina hI, hII y hIII.

Las tres proteasas purificadas presentan un pH óptimo más alcalino que el extractivo crudo, que contiene a las tres proteasas además de otras proteínas inactivas y que presenta un pH óptimo entre 7,5 y 8,5. Este comportamiento sugiere algún tipo de interacción entre ellas o con el entorno generado por las otras proteínas y péptidos, que hace que la preparación no purificada manifieste un pH óptimo desplazado hacia valores un poco más ácidos.

El uso de inhibidores específicos para proteasas cisteínicas arrojó resultados de inhibición positiva, tanto con iodoacetato como con E-64 [trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) butano], observándose una inhibición enzimática total e irreversible en ambos casos.

Determinación de parámetros cinéticos

Para calcular los parámetros cinéticos, previamente la actividad esterolítica fue determinada para cada proteasa, usando los carbobenzoxy-*p*-nitrofenil ésteres de diversos aminoácidos como sustratos (Fig. 5).

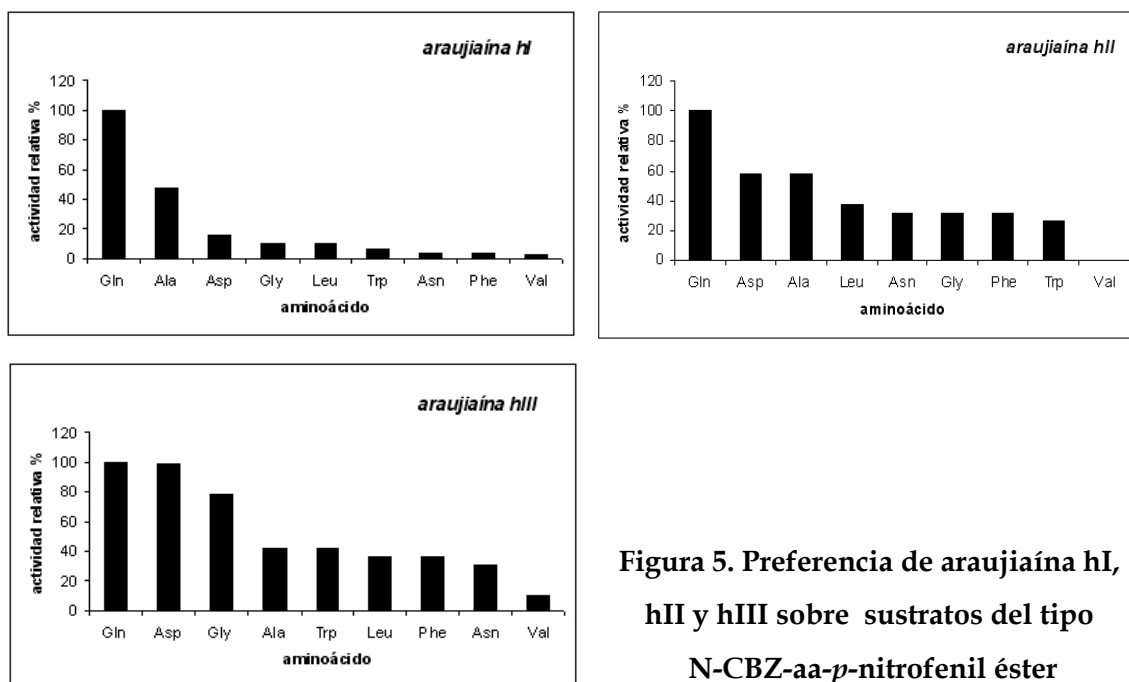


Figura 5. Preferencia de araujiaina hI, hII y hIII sobre sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil éster

El derivado de glutamina fue el mejor sustrato para las tres endopeptidasas estudiadas porque estas enzimas mostraron una mayor preferencia para este derivado. araujiaina h I y araujiaina h II presentaron un perfil similar, donde el derivado de glutamina es seguido en preferencia por los de alanina, ácido aspártico. Sin embargo, la actividad endoesterolítica de araujiaina h II sobre alanina y el derivado aspártico es del mismo orden, mientras que para araujiaina h I la relación alanina-aspártico es 3:1. El comportamiento de actividad esterolítica de araujiaina h III es absolutamente diferente, la enzima mostró una preferencia casi similar por glutamina y por ácido aspártico y también demostró una alta preferencia por el derivado glicina, seguida por alanina y triptófano. Las preferencias de los aminoácidos fueron estimadas en unidades U_{CBZ} (Tabla 2).

N- α -CBZ derivados de aa	Araujiaína h I		Araujiaína h II		Araujiaína h III	
	U _{CBZ}	Preferencia %	U _{CBZ}	Preferencia %	U _{CBZ}	Preferencia %
Gln	59,02	100	6,06	100	72,38	100
Ala	27,50	47,61	2,84	57,89	29,45	41,66
Asp	8,50	16,13	2,84	57,89	71,61	98,96
Gly	5,10	10,45	1,08	31,58	56,34	78,12
Leu	4,85	10,06	1,47	36,84	25,62	36,46
Trp	2,57	6,28	0,70	26,32	29,45	41,66
Tyr	1,08	3,79	—	—	—	—
Asn	0,92	3,52	1,08	31,58	21,78	31,25
Phe	0,77	3,30	1,08	31,58	25,62	36,46
Val	0,32	2,54	0	0	6,45	10,42
Pro	0	0	0	0	0	0
Ile	—	—	0	0	0	0

Tabla 2. Datos numéricos de las preferencias de araujaína hI, hII y hIII.

Dado que el derivado de Gln fue el sustrato por el que las tres enzimas mostraron mayor preferencia, el mismo fue utilizado para la determinación de parámetros cinéticos (k_m y k_{cat}) de las endopeptidasas estudiadas (Tabla 3).

N- α -CBZ-Gln <i>p</i> -nitrofenil éster	K_m (mM)	k_{cat} (seg ⁻¹)	k_{cat}/K_m (Seg ⁻¹ M ⁻¹)
araujaína hI	$2,4 \cdot 10^{-2}$	0,2	$6,5 \cdot 10^3$
araujaína hII	$2,4 \cdot 10^{-1}$	0,2	$9,4 \cdot 10^2$
araujaína hIII	$9,9 \cdot 10^{-2}$	1,1	$1,2 \cdot 10^4$

Tabla 3. Determinación de parámetros cinéticos de araujaína hI, hII y hIII sobre N- α -CBZ-Gln *p*-nitrofenil éster

El cociente k_{cat}/K_m se considera la mejor relación cinética para expresar eficacia catalítica. Según esta relación, araujaína h III mostró la mayor eficiencia esterolítica con el derivado de Gln ensayado, en tanto que araujaína h II exhibió la menor eficiencia catalítica con el mismo sustrato.

Determinación de la secuencia N-terminal

La secuencia N-terminal fue obtenida por el método de Edman para araujaína h II y para araujaína h III (Tablas 4 y 5).

Fuente vegetal / Proteasa	Secuencia	Identidad (%)
<i>Araujia hortorum</i> araujaína h II	VPDSIDWREKDAVLPIRNQGQXGSIWAFXAIASVE	35/35 (100%)
<i>Asclepias fruticosa</i> asclepaína f	LPDSVDWREKGVVFPIRNQ GK	15/21 (71%)
<i>Asclepias syriaca</i> asclepaína a	LPNSIDWRQKNVVFPIKNQG	13/20 (65%)
<i>Carica candamarcensis</i> cisteín proteinasa III	PESIDWRKKGAVTPVKNQGS CGSCWAFSTIATVE	22/34 (64%)
<i>Carica pubescens</i> cisteín proteinasa IV	PESIDWRKKGAVTPVKNQGSXGSXWAFSTIVTVE	22/34 (64%)
<i>Carica papaya</i> . quimopapaína isoforma V	PQSIDWRAKGA VTPVKNQGACGSCWAFSTIATVE	22/34 (64%)
<i>Carica papaya</i> . quimopapaína isoforma IV	PQSIDWRAKGA VTPVKNQGACGSCWAFSTIATVE	22/34 (64%)
<i>Carica papaya</i> . quimopapaína isoforma III	PQSIDWRAKGA VTPVKNQGACGSCWAFSTIATVE	22/34 (64%)
<i>Carica papaya</i> quimopapaína isoforma II	PQSIDWRAKGA VTPVKNQGACGSCWAFSTIATVE	22/34 (64%)
<i>Oryza sativa</i>	LPESVDWREKGA VAPVKNQGQCGSCWAFSAVSTVE	22/35 (62%)
<i>Zingiber officinale</i>	LPDSIDWRENGAVVPVKNQGCGSCWAFSTVA AVE	22/35 (62%)
<i>Carica candamarcensis</i> cisteín proteinasa IV	PESIDWRKKGAVTPVKNQGS CGSCWAFSTIVTVE	21/34 (61%)
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	LPESIDWREKGA VTAVKNQGS CGSCWAFSTVA AVE	21/35 (60%)
<i>Zinnia elegans</i>	LPKSVDWRKKGAVSPVKNQGQCGSCWAFSTVA AVE	21/35 (60%)
<i>Ananas comosus</i>	VPQSIDWRDSGAVTSVKNQGR CGSCWAFASIATVE	21/35 (60%)
<i>Morrenia odorata</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQ GKXGSXWTFSAVASI	20/34 (59%)
<i>Morrenia brachystephana</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQ GKKG	14/24 (58%)
<i>Asclepias syriaca</i> asclepaína b	LPNFVDWRKNGVVFPIRNQGQ	12/21 (57%)
<i>Carica papaya</i> papaya proteinasa omega	LPENV DWRKKGAVTPVRHQSGSCWAFSAVATVE	20/35 (57%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPKSVDWRKKGAVAPVKDQGQCGSCWAFSTVA AVE	20/35 (57%)
<i>Carica papaya</i> papaya proteinasa I	IP EYVDWRQKGA VTPVKNQGS CGSCWAFSAVVTIE	18/35 (51%)

Tabla 4. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína hII con la de otras proteasas.

Fuente vegetal / Proteasa	Secuencia	Identidad (%)
<i>Araujia hortorum</i> araujaína h III	LPESVDWRKKNLVFPVRNQGQXGSXXAFSAVAXI	34/34 (100%)
<i>Morrenia brachystephana</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKKG	20/24 (83%)
<i>Morrenia odorata</i>	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKXGSXWTFSAVASI	28/34 (82%)
<i>Asclepias fruticosa</i> Asclepaína f	LPDSVDWREKGVVFP I RNQ GK	16/21 (76%)
<i>Asclepias syriaca</i> asclepaína b	LPNFVDWRKNGVVFP I RNQ GQ	15/21 (71%)
<i>Oryza sativa</i>	LPESVDWREKGAVAPVKNQGQCGSCWAFSAVSTV	23/34 (67%)
<i>Zinnia elegans</i>	LPKSVDWRKKGAVSPVKNQGQCGSCWAFSTVA AV	23/34 (67%)
<i>Carica papaya</i> papaya proteinasa omega	LPENVDWRKKGAVTPVRHQGSCGSCWAFSAVATV	23/34 (67%)
<i>Asclepias syriaca</i> Asclepaína a	LPNSIDWRQKNVVFP I KNQ G	13/20 (65%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPKSVDWRKKGAVAPVKDQGQCGSCWAFSTVA AV	22/34 (64%)
<i>Brassica napus</i>	LPVSVDWRKKGAVTP IKDQGLCGSCWAFSAVA AI	22/34 (64%)
<i>Carica pubescens</i>	PESIDWRKKGAVTPVKNQGSXGSXWAFSTIVTV	21/33 (63%)
<i>Dianthus caryophyllus</i>	LPESVDWRKKGAVSHVKDQGQCGSCWAFSAIGAV	21/34 (61%)
<i>Carica papaya</i> papaya proteinasa I	IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGS CGSCWAFSAVV TI	21/34 (61%)
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	LPESIDWREKGAVTAVKNQGS CGSCWAFSTVA AV	20/34 (58%)
<i>Carica candamarcensis</i> cisteínproteínasa IV	PESIDWRKKGAVTPVKNQGS CGSCWAFSTIVTV	19/33 (57%)
<i>Zingiber officinale</i>	LPDSIDWRENGAVVPVKNQGGCGSCWAFSTVA AV	19/34 (55%)

Tabla 5. Comparación de la secuencia N-terminal de araujaína hIII con la de otras proteasas.

Las secuencias N-terminales de araujaína h II (35 aminoácidos) y de araujaína h III (34 aminoácidos) tienen un alto porcentaje de identidad con proteasas aisladas de especies del género *Asclepias* y una considerable homología con las proteasas cisteínicas del género *Caricaceae*. La comparación con papaína, considerada como el arquetipo de los peptidasas cisteínicas, demostró un notable grado de identidad (55% y 64%) con araujaína h II y araujaína h III, respectivamente. Ambas proteinasas compartieron tres motivos (DWR, QG y CGS) con la mayor parte de las secuencias analizadas. Aunque

araujaína h II y araujaína h III pertenecen a la misma especie y sus características son similares, presentaron distinto aminoácido N-terminal (Val y Leu, respectivamente) y demostraron tener entre ellas solamente un 53% de identidad. Al haberse determinado que el N-terminal de araujaína hI se encontraba bloqueado, se decidió analizar una secuencia interna. (Tabla 6).

Fuente vegetal /Proteasa	Secuencia	Identidad (%)
<i>Araujia hortorum</i> Araujiaína h I	AFTYVAKNGITSRDKYPYRGQQGQCYQLQKVVRISGYQSV	41/41 (100%)
<i>Hemerocallis</i> sp.	AFEFIQKNGITTEDSYPIAEQDGTCSNLLNSPVVSIDGHQDVP	21/44 (48%)
<i>Carica papaya</i> papaya proteínasa	ALEYVAKNGIHLRSKYPYKAKQGTCAKQVGGPIVKTSGVGRVQ	21/44 (48%)
<i>Brassica napus</i>	AFQFIMKNGGLNTEKDYPYHGTNGKCNLLKNSRVVTIDGYEDVP	21/45 (47%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AFEFIKNGGIDTDKDYPIKGVDTCDQIRKNAKVVTIDSYEDVP	21/45 (47%)
<i>Zingiber officinale</i>	AFQFIVNNGGINSEETYPIRGQDGCNSTVNAPVVSIDSYENVP	20/44 (45%)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	AFQFIIQNGGIDTEEDYPYQGIDGTCDQTKKKTQVQIDGYEDVP	20/45 (44%)
<i>Zinnia elegans</i>	AFAYVTRNGLHKEEYPYIMSEGTCDKRDASEKVTISGYHDVP	19/44 (43%)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	AFQFIIQNGGIDTEEDYPYQGIDGTCDQTKKKTQVQIDGYEDVP	19/45 (42%)
<i>Oryza sativa</i>	AFDFIIKNGGIDTEDDYPYKAVDGKCDINRENAKVVSIDGFEDVP	19/45 (42%)
<i>Carica papaya</i> quimopapaína	YVANNGVHTSKVYPYQAKQYKCRATDKPGPKVKITGYKRV	17/41 (42%)
<i>Pisum sativum</i>	AYRFIVENGGLDSQIDYPYLGRQSTCNQAKKNTKVVSINGYKNV	18/44 (41%)
<i>Vicia sativa</i>	AFEFIKQNGITTESNYPYAAKDGTCDEKEDKAVSIDGHENVP	17/43 (40%)
<i>Cicer arietinum</i>	AFEFIIRNGGIDTDQDYPIYNGFERKCDPTKKNKVVVSIDGYEDVP	18/45 (40%)
<i>Zea mays</i>	AFEFIINNGGIDTEKDYPYKGTGRCVNRKNAKVVTIDSYEDVP	18/45 (40%)
<i>Pisum sativum</i>	AFEFIKQNGITTESNYPYAAKDGTCDLKKEDKAEVSIDGYENVP	17/44 (39%)
<i>Glycine max</i>	SFEWVLEHGGIATDDYPYRAKEGRCKANKIQDKVTIDGYETL	17/43 (40%)
<i>Carica</i> <i>candamarcensis</i>	YVVDHGVHTEKEYPYEEKQYKCRAKDKKPPIVKISGYKKVP	16/41 (39%)
<i>Actinidia deliciosa</i>	FQFIINNGGINTEENYPYTAQDGE CNVELQNEKYVTIDTYENVP	17/44 (39%)
<i>Actinidia chinensis</i>	FQFIINNGGINTGENYPYTAQDGE CNLDLQNEKYVTIDTYGNVP	17/44 (39%)

Tabla 6. Comparación de una secuencia interna de araujaína hI con las de otras proteasas cisteínicas de origen vegetal.

El bloqueo del sector N-terminal también había sido reportado para las calotropinas DI y DII aisladas de *Calotropis gigantea* (Sengupta *et al.*, 1984). En el caso de araujaína hI se determinó la secuencia de un péptido interno (41 residuos) obtenido por hidrólisis con la proteasa V8 (endopeptidasa Glu-C) y se comparó con las secuencias internas de dieciocho proteinasas cisteínicas de origen vegetal, ninguna de los cuales pertenece a la familia de *Asclepiadaceae*, ya que solamente las secuencias N-terminales (Lynn *et al.*, 1980) y C-terminales (Sengupta *et al.*, 1984) de proteinasas de especies de esta familia se ha informado. Sin embargo, se obtuvo un grado de homología notable (las identidades van del 36 al 48% y los positivos del 55 al 67%) y también se observan varios motivos muy conservados (YPY en todos los casos; AF, NG, GXC, KVV o K VX o XVV, y VP, en la mayoría de los casos). Esto sugiere que araujaína hI probablemente comparte un gen ancestral con las proteasas cisteínicas obtenidas de especies taxonómicamente menos relacionadas.

El análisis por MALDI-TOF de los péptidos productos de la digestión triptica permitió obtener el peptide mass fingerprint (PMF) de la enzima (Fig. 6). Utilizando el mapa triptico realizado y empleando la herramienta MASCOT se realizaron búsquedas a fin de identificar la proteína original. Mediante este software no se encontraron proteínas que permitieran establecer la identidad de esta enzima con valores aceptables. Esto se debe a que nuestras muestras, al ser recientemente estudiadas, no se encuentran en las bases de datos. Cabe destacar que la obtención del mapa peptídico (peptide mass fingerprint) ya se ha convertido en una herramienta proteómica valiosa, ya que permite caracterizar nuevas enzimas y diferenciar isoenzimas.

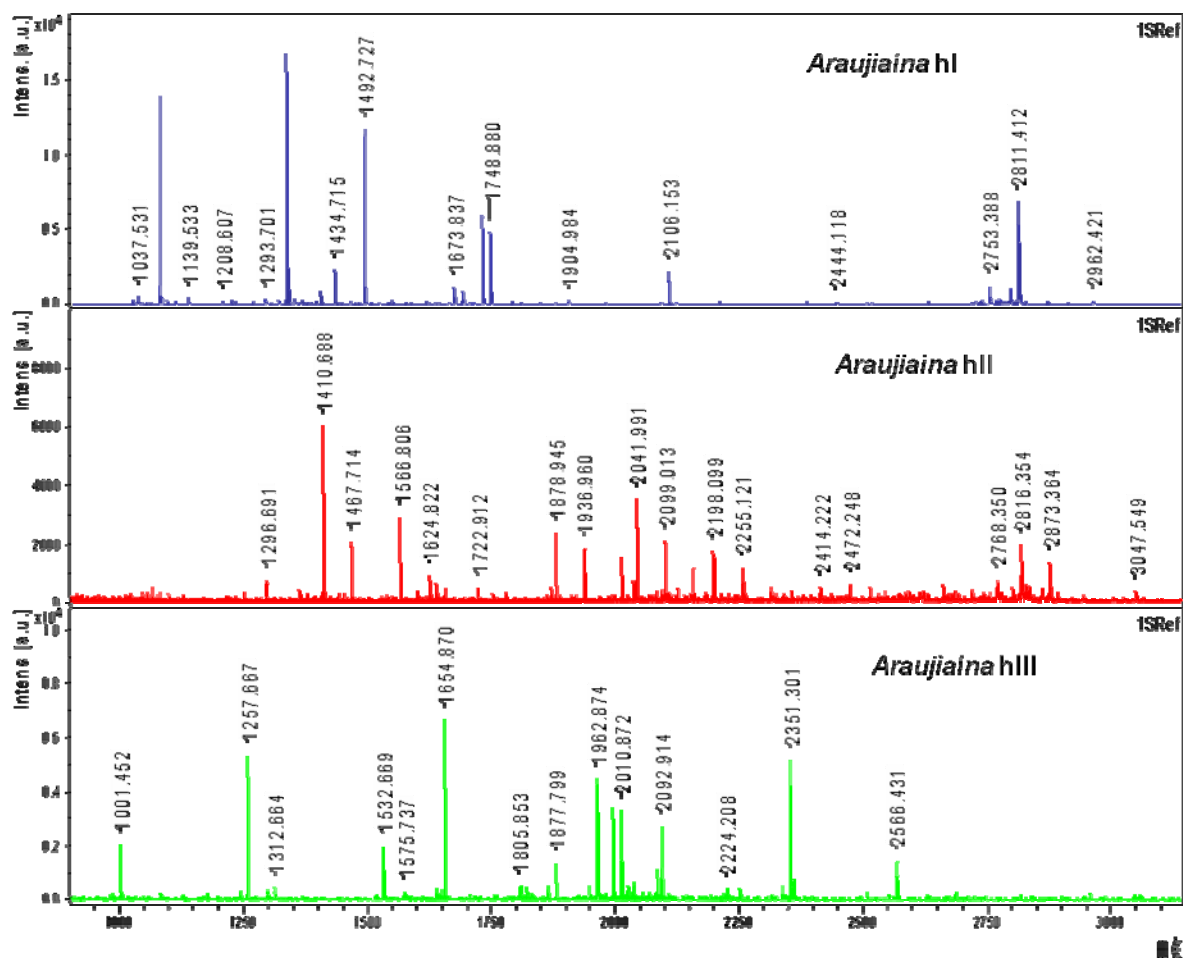
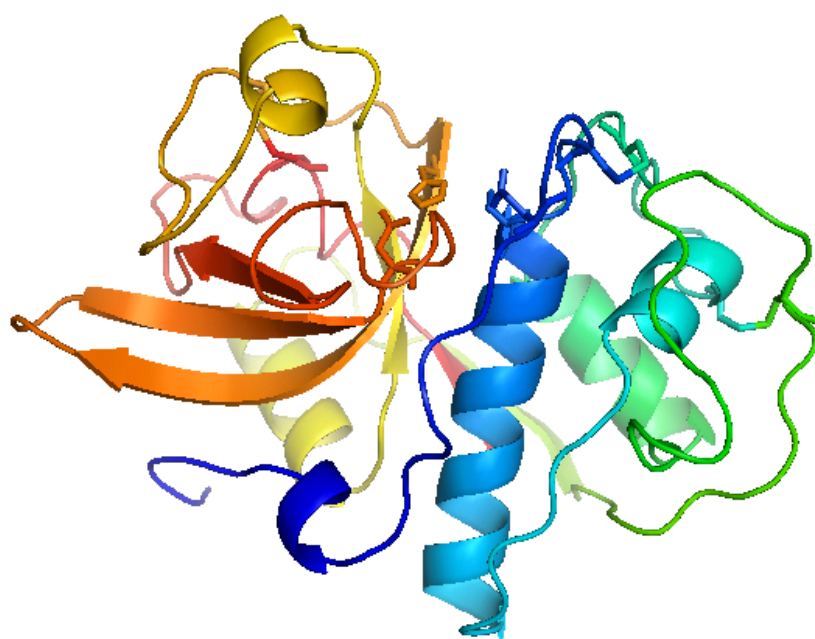


Figura 6. Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF provenientes de la digestión trípica de araujiaina hI, hII y hIII con papaína.

Los PMF analizados confirmaron que se trata de enzimas distintas, a pesar de que poseen características biofísicoquímicas muy similares. Debido a su ubicación celular y a sus funciones se trataría de isoenzimas. En los espectros se observó que ninguna de las dos muestras posee picos iguales, lo que fortalece la idea de que no son las mismas enzimas. Por otro lado no se encontraron picos de igual peso molecular provenientes de secuencias conservadas. La ausencia de picos comunes puede ser debida a un pequeño cambio posicional de residuos Arg y Lys, que producen péptidos de peso molecular diferentes a pesar que las secuencias sean muy similares. El análisis de PMF permite diferenciar este tipo de enzimas, aunque esta herramienta no es útil para la identificación de isoenzimas sin antes conocer previamente las secuencias proteicas. Estos resultados representan una contribución interesante para las bases de datos de PMF con información sobre endopeptidasas vegetales.

hI m/z	Intensidad	hII m/z	Intensidad	hIII m/z	Intensidad
1026,59	287,00	1296,69	746,12	1001,45	1914,16
1035,51	251,71	1410,69	6198,05	1243,64	320,10
1037,53	468,60	1467,71	1837,79	1257,67	5549,20
1043,61	171,61	1469,71	474,56	1298,66	381,87
1081,52	14787,61	1566,81	2848,27	1312,66	448,41
1097,52	211,62	1624,82	773,65	1532,67	1751,26
1113,52	198,70	1638,77	621,05	1575,74	301,73
1139,53	454,46	1722,91	498,63	1639,97	245,47
1208,61	266,74	1878,95	1870,64	1654,87	6400,47
1226,58	234,70	1881,93	405,09	1805,85	438,17
1293,70	310,04	1936,96	1748,61	1810,96	382,43
1319,61	261,93	2010,99	1364,53	1821,78	284,40
1337,69	19060,00	2036,07	484,89	1863,86	366,47
1342,73	162,65	2039,97	506,62	1877,80	1019,39
1353,70	326,45	2041,99	2794,16	1947,96	392,82
1434,71	2399,65	2099,01	1686,70	1962,87	4242,42
1491,74	4023,41	2156,03	966,91	1995,10	2928,84
1492,73	8853,62	2198,10	1394,63	2009,10	1025,00
1673,84	1149,01	2255,12	895,02	2010,87	2900,02
1690,87	823,19	2414,22	295,55	2035,89	540,48
1692,86	189,33	2472,25	361,64	2083,13	989,36
1730,86	1730,09	2768,35	420,37	2092,91	2184,43
1731,85	4387,67	2816,35	1194,41	2224,21	323,71
1748,88	4460,81	2826,41	303,88	2250,01	321,85
1904,98	143,39	2873,36	790,94	2336,32	339,26
2091,22	105,06	3047,55	182,31	2351,30	4023,26
2106,15	1716,90			2359,25	496,13
2444,12	94,26			2566,43	955,50
2753,39	875,85			3452,67	167,72
2795,40	624,19			3510,73	230,43
2811,41	4428,34				
2962,42	97,63				

Tabla 7. Datos numéricos correspondientes a los mapas peptídicos (peptide mass fingerprint, PMF) de araujaína hI, hII y hIII.



RESULTADOS & DISCUSIÓN

*Clonado y secuenciamiento
de araucariaína aII*

CLONADO Y SECUENCIAMIENTO DE ARAUJIAÍNA AII

Con el objeto de conocer la secuencia completa de alguna de las proteasas caracterizadas se intentó el clonado de las mismas empleando como material de partida el RNA total del látex de *Araujia angustifolia* y de *Araujia hortorum*. El diseño de los cebadores (primers) necesarios en las diferentes etapas se realizó en base a secuencias conocidas (N-terminal y péptido interno) de las enzimas purificadas (ver M&M, 4.1).

Aislamiento del cDNA

A partir del látex de *Araujia angustifolia* y de *A. hortorum* se extrajo el RNA total (*cfr.* 4.2.1, M&M), con el propósito de obtener los cDNA de las proteasas presentes en cada una de las muestras mediante 3'RACE (*cfr.* 4.2.2, M&M).

En primer término se obtuvo la primera cadena de cDNA por RT (*cfr.* 4.2.2.1, M&M) empleando el *primer* RoR₁polidT (Fig. 1).

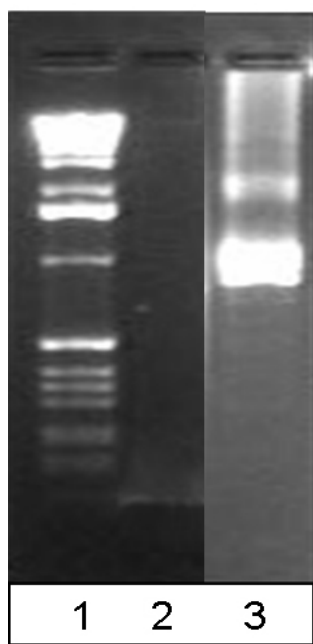


Figura 1. Electroforesis de agarosa al 2% de los productos de RT amplificados por PCR.

Calle 1: patrones de PM "DNA MW Marker X", Roche. Calle 2: control negativo de RT-PCR. Calle 3: control positivo de RT-PCR.

Luego, utilizando como molde la cadena de cDNA obtenida en el paso anterior y los *primers* Nd₁₋₈ y Ro ó CAapo1 y Ro se obtuvieron por PCR (*cfr.* 4.2.2.2, M&M) productos del tamaño esperado para moléculas de cDNA que codifican proteínas de unos 240 residuos aproximadamente (*ca.* 24 kDa), características de las proteasas en estudio. La Fig. 2 corresponde a la electroforesis en agarosa al 2% (*cfr.* 4.3., M&M) de los productos de PCR de los cDNAs obtenidos de la RT.

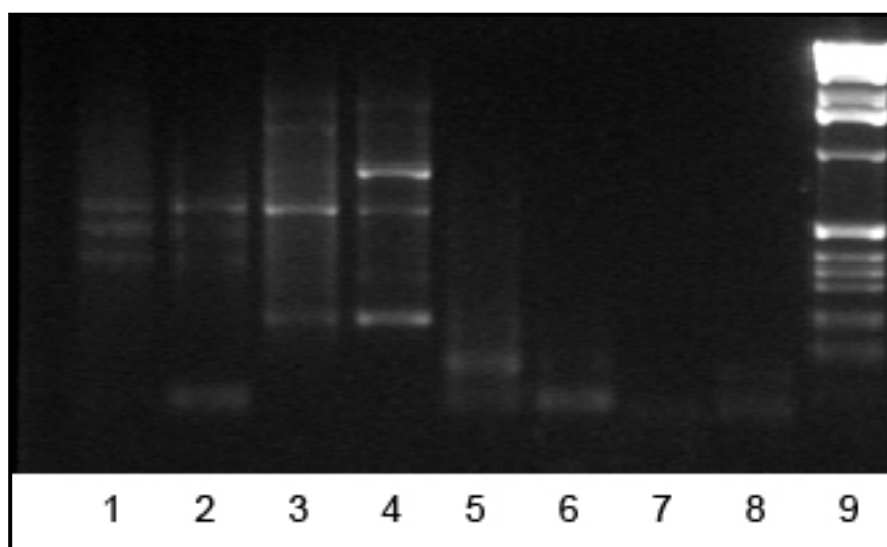


Figura 2. Electroforesis de agarosa al 2% de los productos de la PCR de los cDNAs obtenidos de la RT, mediante el empleo de los *primers* Nd₁₋₈ y R₀ ó CAapo1 y R₀. Calle 1: muestra A (*A. angustifolia*, en buffer RLC, con *primers* CAapo1 y R₀). Calle 2: muestra B (*A. angustifolia*, en buffer RLC, con *primers* Nd₁₋₈ y R₀). Calle 3: muestra C (*A. angustifolia*, en buffer RTL, con *primers* CAapo1 y R₀). Calle 4: muestra D (*A. angustifolia*, en buffer RTL, con *primers* Nd₁₋₈ y R₀). Calle 5: muestra E (*A. hortorum*, en buffer RLC, con *primers* CAapo1 y R₀). Calle 6: muestra F (*A. hortorum*, en buffer RLC, con *primers* Nd₁₋₈ y R₀). Calle 7: muestra G (*A. hortorum*, en buffer RTL, con *primers* CAapo1 y R₀). Calle 8: muestra H (*A. hortorum*, en buffer RTL, con *primers* Nd₁₋₈ y R₀). Calle 9: patrones de PM “DNA MW Marker X”, Roche.

En las calles 1, 2 y 3 se observan bandas de 700 pb y en la calle 4 se observan claramente dos bandas de aproximadamente 700 pb y 800 pb; todas ellas son del tamaño esperado y corresponden a muestras provenientes del látex de *Araujia angustifolia*. No aparecieron bandas de interés en las otras calles que corresponden a muestras de *Araujia hortorum*, por lo que los *primers* utilizados no fueron lo suficientemente específicos para la obtención de los cDNA de proteasas de dicha especie y el trabajo debió continuarse solamente con las muestras de *Araujia angustifolia*.

La identidad de los productos de PCR provenientes de las muestras de *A. angustifolia* fue confirmada sometiendo a una segunda reacción de PCR, para la cual se utilizaron los *primers* más internos CAapo2 y R₁ o NTapo2 y R₁. Esta técnica es denominada Nested-PCR (*cfr.* 4.2.2.3, M&M). En la Fig. 3 se observan los productos de Nested-PCR en un gel

de agarosa al 2% en el que se evidencia la amplificación específica de las bandas antes mencionadas, mientras que la Fig. 4 muestra las bandas que fueron seleccionadas y cortadas para la extracción de los correspondientes cDNAs

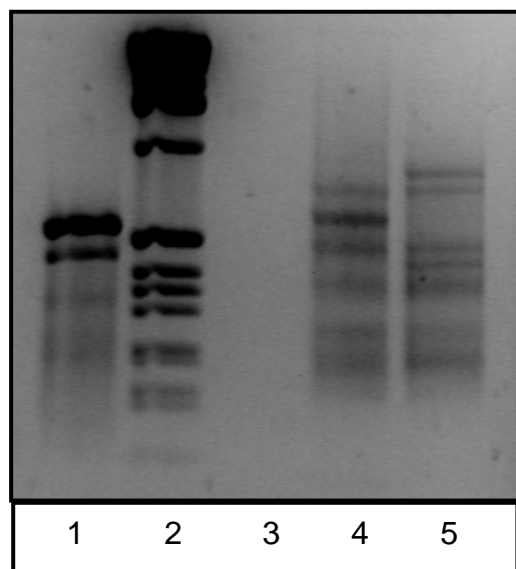


Figura 3. Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de Nested-PCR. Calle 1: Nested-PCR de las muestras A y B utilizando los primers CAapo2 y R₁. Calle 2: patrones de PM "DNA MW Marker X", Roche. Calle 3: control negativo de Nested-PCR. Calle 4: Nested-PCR de la muestra C utilizando los primers NTapo2 y R₁. Calle 5: Nested-PCR de la muestra D. utilizando los primers NTapo2 y R₁.

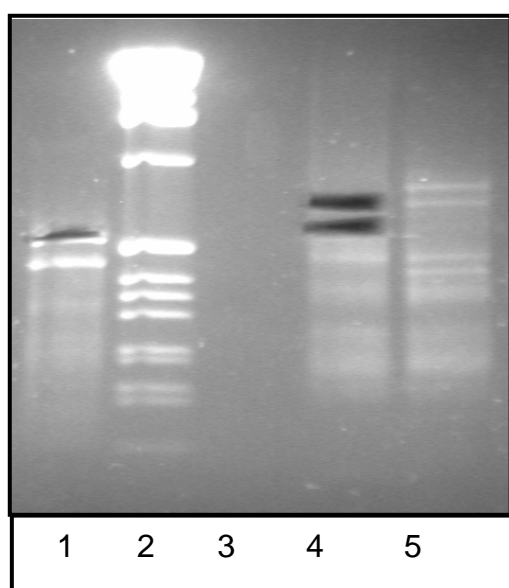


Figura 4. Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de Nested-PCR. Revelado negativo de la electroforesis mostrada en la Fig. 3. Se observan en negro algunas de las bandas seleccionadas que fueron cortadas y utilizadas para la extracción del cDNA

Clonado de araujiaina aII (colony PCR y cuantificación de la miniprep)

El cDNA proveniente de las bandas seleccionadas de la electroforesis realizada con los productos de reacción de la Nested-PCR fue extraído del gel (Fig. 4), purificado y posteriormente clonado (*cfr.* 4.6, M&M) en *E. coli* (XL1-Blue) utilizando el vector pGEM-T Easy, Promega (Fig. 5).

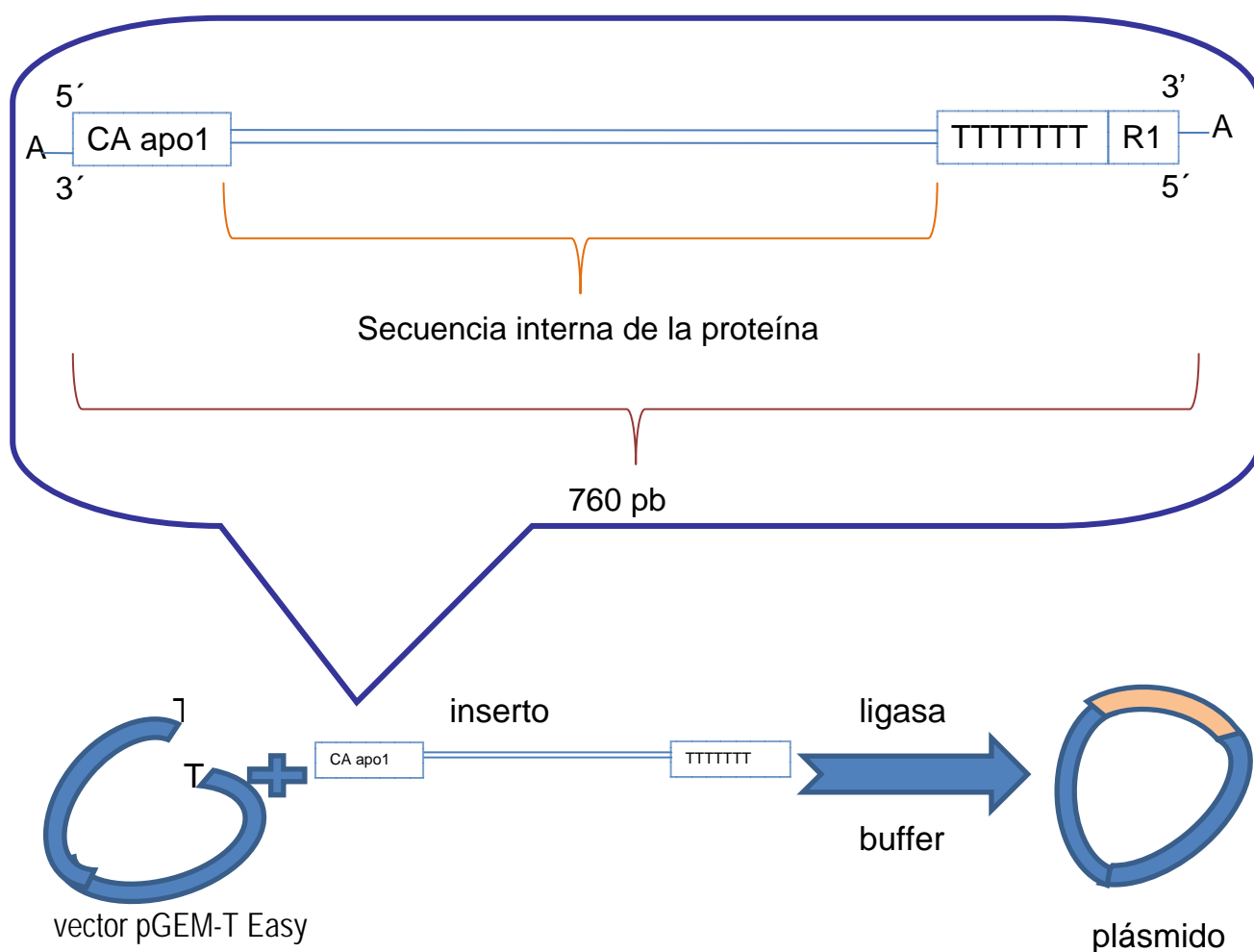


Figura 5. Esquema del inserto del cDNA de *Araujia angustifolia* purificado previamente a su incorporación en el vector pGEM-T Easy, Promega (arriba) e inserción del mismo en el vector para la obtención del plásmido (abajo).

La inserción del cDNA de interés en los plásmidos de los clones que dan colonias blancas fue verificada a través de PCR (*cfr.* 4.2.2.2, M&M) utilizando los *primers* Nd₁₋₈ y CAapo1 junto al primer R1, seguida de electroforesis en gel de agarosa al 2% para visualizar los productos de reacción.

Los clones que por PCR amplificaron una banda del tamaño esperado fueron seleccionados para ser secuenciados. Además, con el fin de obtener el DNA plasmídico en cantidad suficiente para poder ser secuenciado se prepararon cultivos de cada uno de estos clones y se realizó la extracción del mencionado material plasmídico (*cfr.* 4.8.1, M&M).

Una alícuota de cada una de las muestras fue digerida con la enzima de restricción EcoR I y posteriormente fueron cuantificadas utilizando un gel de agarosa al 1%. En la Fig. 6) se muestra la electroforesis de los productos de la digestión.

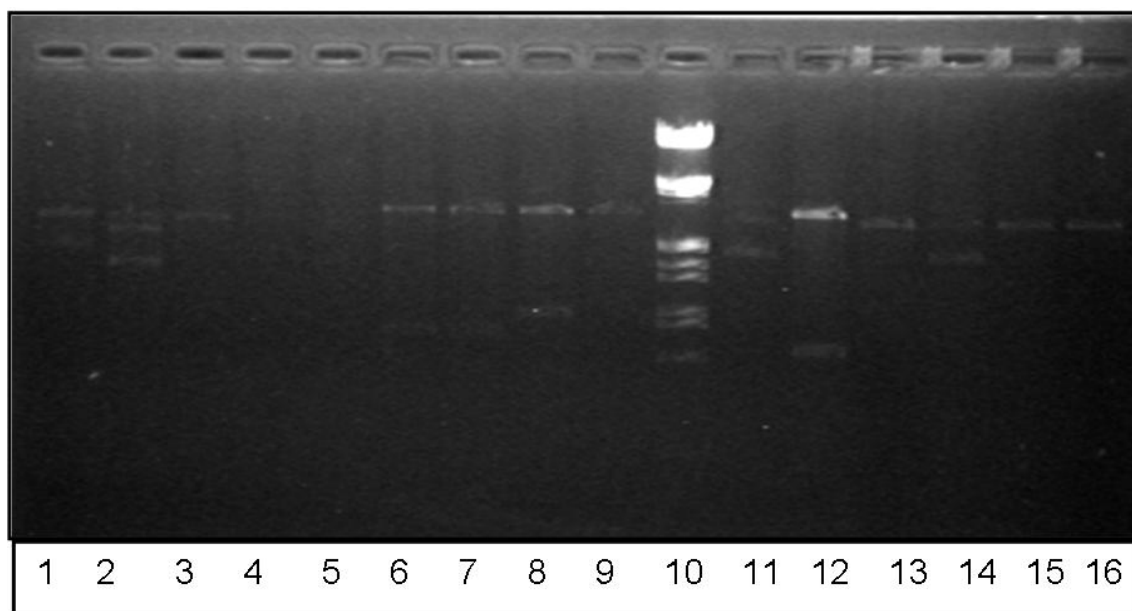


Figura 6. Electroforesis de agarosa al 1% de los DNA plasmídicos, digeridos con EcoRI. Calles 1 a 9 y 11 a 16: productos de la digestión de los DNA plasmídicos provenientes de la clonación. Calle 10: patrones de PM “DNA MW Marker III”, Roche.

Se seleccionaron las muestras provenientes de los clones que dieron bandas cercanas a 760 pb y fueron enviadas a secuenciar. Se solicitó la secuenciación utilizando los *primers* “T7 promotor” y “SP6 promotor” (cada uno de estos *primers* permiten amplificar a partir de cada uno de los extremos la zona de inserción de DNA en el vector pGEM-T Easy), lo que posibilitó la obtención de la secuencia de las dos cadenas de DNA para cada uno de los clones.

Obtención de la secuencia consenso

La secuencia consenso que fue obtenida luego de analizar y procesar con el Clustal-W las secuencias de los clones mencionados en el punto anterior. Para traducir la secuencia de nucleótidos a secuencia de aminoácidos se utilizó la herramienta de Internet del sitio <http://expasy.org/tools/dna.html>, que a partir de una secuencia de nucleótidos encuentra marcos de lectura en las 6 alternativas posibles y proporciona secuencias de

aminoácidos que son luego analizadas. Dicho análisis consiste en tratar de identificar en cada secuencia la presencia de motivos que estén altamente conservados en proteasas cisteínicas.

Se determinó la secuencia a partir del aminoácido 26 y hasta el aminoácido 213, donde aparece la señal de stop de la secuencia nucleotídica. Sólo se pudo establecer la secuencia a partir del aminoácido 26 porque los cebadores utilizados fueron diseñados en base a una secuencia perteneciente a una región altamente conservada (aminoácidos 19 al 25) del sitio activo de la enzima.

Se aplicó la metodología de Peptide Mass Fingerprint (PMF) tanto a la enzima pura y caracterizada bioquímicamente como a la secuencia polipeptídica obtenida por clonado y secuenciamiento. La comparación de los péptidos generados en cada caso permitió identificar a la enzima secuenciada como araujaína a II, una de las principales isoenzimas presentes en el látex de *Araujia angustifolia*. El N-terminal secuenciado por el método de Edman fue adicionado a la secuencia parcial y de esta manera se obtuvo la secuencia completa de la enzima, que consta de 213 aminoácidos.

La Tabla 1 indica las masas de los péptidos obtenidos por PMF para la proteasa araujaína aII pura comparadas con las masas de los péptidos producto de la digestión trípica teórica de la proteasa clonada. Debe tenerse en cuenta que la digestión teórica fue a partir del aminoácido 19, por eso la falta de algunos picos. De todos modos se observa una alta coincidencia.

m/z(exp.)	m/z(teóricos)
1.083,799	
1.142,834	
1.452,625	1.451,695
1.602,703	1.601,680
1.618,712	1.617,675
1.645,767	
1.707,890	1.706,809
1.721,911	1.722,804
1.749,987	
1.865,002	1.865,853
2.493,835	2.493,172
2.559,844	

Tabla 1. Comparación de las masas obtenidas por PMF para araujaína aII pura comparadas con las masas de los péptidos productos de la digestión trípica teórica de la proteasa clonada.

La Figura 7 muestra la secuencia consenso del cDNA de araujiaina aII con su correspondiente secuencia aminoacídica. El triplete “taa” que se muestra en rojo y subrayado indica la señal de stop para la síntesis proteica y la secuencia “aataaa” que se muestra resaltada en amarillo corresponde a la secuencia señal de poliadenilación. Los residuos de la secuencia polipeptídica que se muestran en azul corresponden al péptido secuenciado por el método de Edman (*cfr.* 2, M&M) que fueron adicionados para obtener la secuencia completa.

1	caaggaaaatgtgggagttgctggctcattctcggcagtt	39
1	L P D S V D W R D K G V V F P P R R Q G K C G S C W S F S A V	31
40	gctgccatggaaaccctcggtgggattaaatacgggtcgtagtattgcattatcagagcaa	99
32	A A M E T L V G I K Y G R M I A L S E Q	51
100	gagctattggactgcgaaagaacaagttatgggtgtcgaggaggtttctatgaggctgca	159
52	E L L D C E R T S Y G C R G G F Y E A A	71
160	tttacgtatgtagccaggaatggtattaccactcgggacaaatatccatataggggtcaa	219
72	F T Y V A R N G I T T R D K Y P Y R G Q	91
220	caagggcaatgttatcaattgcaaaaagtgggttagaatttctggttatcagagcgtagct	279
92	Q G Q C Y Q L Q K V V R I S G Y Q S V P	111
280	cgttataacgagggactacttctacgtgctggtgcaggaggagtagtcagtggtgccgtt	339
112	R Y N E G L L L R A V A G G V V S V A V	131
340	aaatctaaaagtagagatttccagttctatcaatcgggtttatttactggagcttgccgt	399
132	K S K S R D F Q F Y Q S G L F T G A C G	151
400	ccgaaattggatcatgcagtgatctcgttggtatgttactggaggtggaagtaagtat	459
152	P K L D H A V N L V G Y V T G G G S K Y	171
460	tggattttgagaaactcttgggttacaacttggggagaggggtggatacatgagacttcca	519
172	W I L R N S W G T T W G E G G Y M R L P	191
520	atgaatgcaggaccggtgaaggttattgtggagttgccacgcagccgcttatcctgtt	579
192	M N A G P A E G Y C G V A T Q P A Y P V	211
580	atgaat taa aagagtcaagaaaacttacgcatttcaagacaaaatatattatatatgtgt	639
212	M N	213
640	gattcctatatgaattgaataaaaacttttctattgatgggttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	701

Figura 7. Alineamiento de la secuencia consenso del cDNA de araujiaina aII con su correspondiente secuencia aminoacídica

La secuencia proteica obtenida de araujiaina aII fue introducida en el programa GPMW para calcular algunas de las propiedades fisicoquímicas del polipéptido: masa molecular relativa (23390,66 D), masa monoisotópica (23375,48D), coeficiente de extinción

molar a 280 nm ($48010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y absorptividad molar 2,053, pI con los -SH reducidos (9,36) y con -SH oxidados (10,05).

El pI calculado es básico y cercano al valor experimental para araujaína aII (pI 8,5). Por su parte, el valor de masa iónica de la secuencia presenta una diferencia de 114 D en comparación al obtenido por MALDI-TOF MS (23489), lo que podría deberse a fosforilaciones, ya que en la secuencia de araujaína aII se observan motivos diana característicos para este tipo de modificaciones.

La Figura 8 muestra la propensión o tendencia de las diferentes regiones de la cadena polipeptídica para adoptar diferentes estructuras secundarias

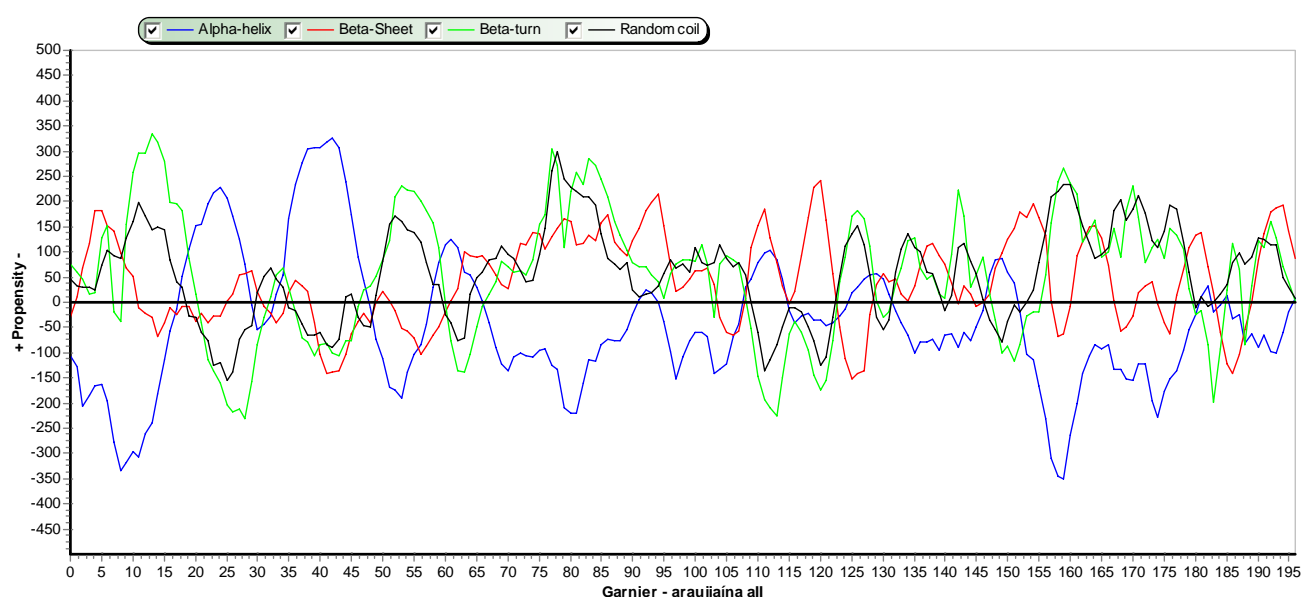


Figura 8. propensión o tendencia de las diferentes regiones de la cadena polipeptídica de araujaína aII para adoptar diferentes estructuras secundarias. — = alfa hélice; — = lámina plegada beta; — = giros beta ; — = ordenamiento al azar

En la Figura 9 se muestra el grado de hidrofiliidad/hidrofobicidad de los aminoácidos que constituyen la proteína. El índice de hidropatía es un número que representa las propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas de la proteína: cuanto mayor es el número, más hidrofóbico es el aminoácido (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>). La información, que da cuenta del carácter hidrofóbico de una proteína, puede resultar de utilizad para predecir su posible distribución en la membrana celular, la ubicación de sitios antígenicos y las regiones que se encuentran con mayor frecuencia en la superficie celular.

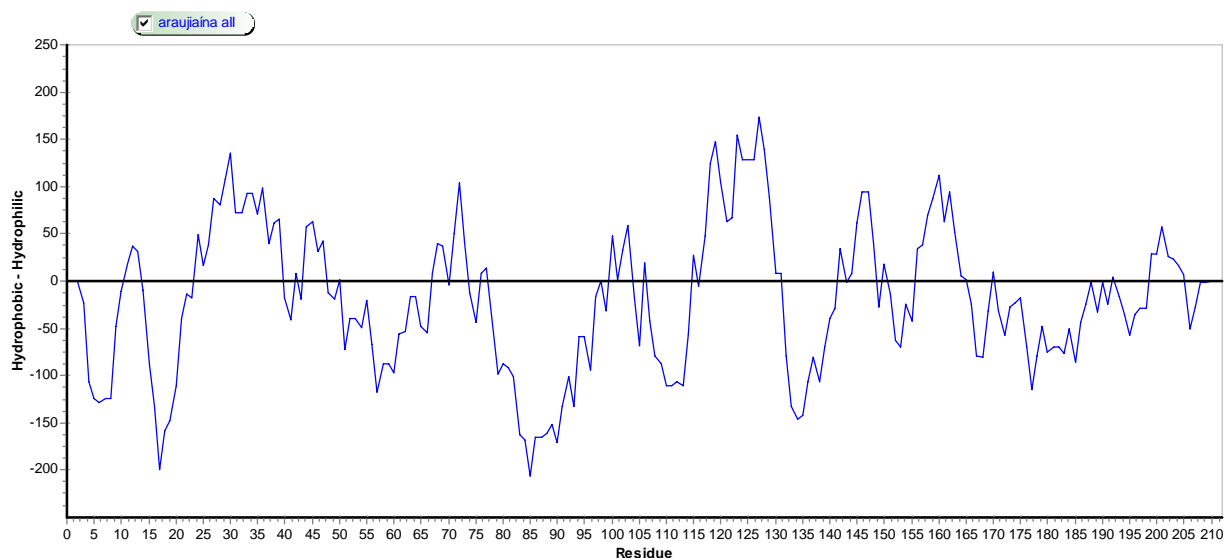


Figura 9. Grado de hidrofiliidad/hidrofobicidad de los aminoácidos que constituyen la proteína

En la Tabla 2 se muestra la composición aminoacídica de araujaína aII, que contiene un 34,7 % de aminoácidos esenciales para adultos (Phe, Ile, Leu, Lys, Met, Thr, Trp, Val) y un 42,3% de aminoácidos esenciales para niños (los anteriores más Arg e His), dato relevante en el caso de la utilización de esta proteasa en la obtención de hidrolizados a partir de proteínas alimentarias. En el ángulo superior derecho se indica la composición elemental de la proteasa clonada.

aa	repeticiones	%	aa	repeticiones	%
Asp	7	3,29	Cys	7	3,29
Asn	6	2,82	Met	5	2,35
Thr	10	4,69	Ile	5	2,35
Ser	14	6,57	Leu	14	6,57
Glu	8	3,76	Tyr	15	7,04
Gln	11	5,16	Phe	7	3,29
Pro	10	4,69	Lys	9	4,23
Gly	29	13,62	His	1	0,47
Ala	16	7,51	Trp	5	2,35
Val	19	8,92	Arg	15	7,04

Átomo	Nº total	%
C	1043	32,23
H	1590	49,13
N	291	8,99
O	300	9,27
S	12	0,37

Tabla 2. Composición aminoacídica y fórmula elemental de araujaína aII.

Análisis de homología

La secuencia consenso obtenida para araujiaina aII (LPDSVDWRDKGVVFPPRRQGKCGSCWSFSAVAAMETLVGIKYGRMIALSEQELLDCERTSYGCRGGFYEAFTYVARNGITTRDKYPYRGQQGQCYQLQKVVRISGYQSVPRYNEGLLLRAVAGGVVSVAVKSKSRDFQFYQSGLFTGACGPKLDHAVNLVGYVTGGGSKYWILRNSWGTTWGEGGYMRLPMNAGPAEGYCGVATQPAYPVMN) fue analizada por PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), observándose dominios conservados característicos de la subfamilia C1A de proteasas cisteínicas, cuya proteasa tipo es la papaína (Fig. 10).

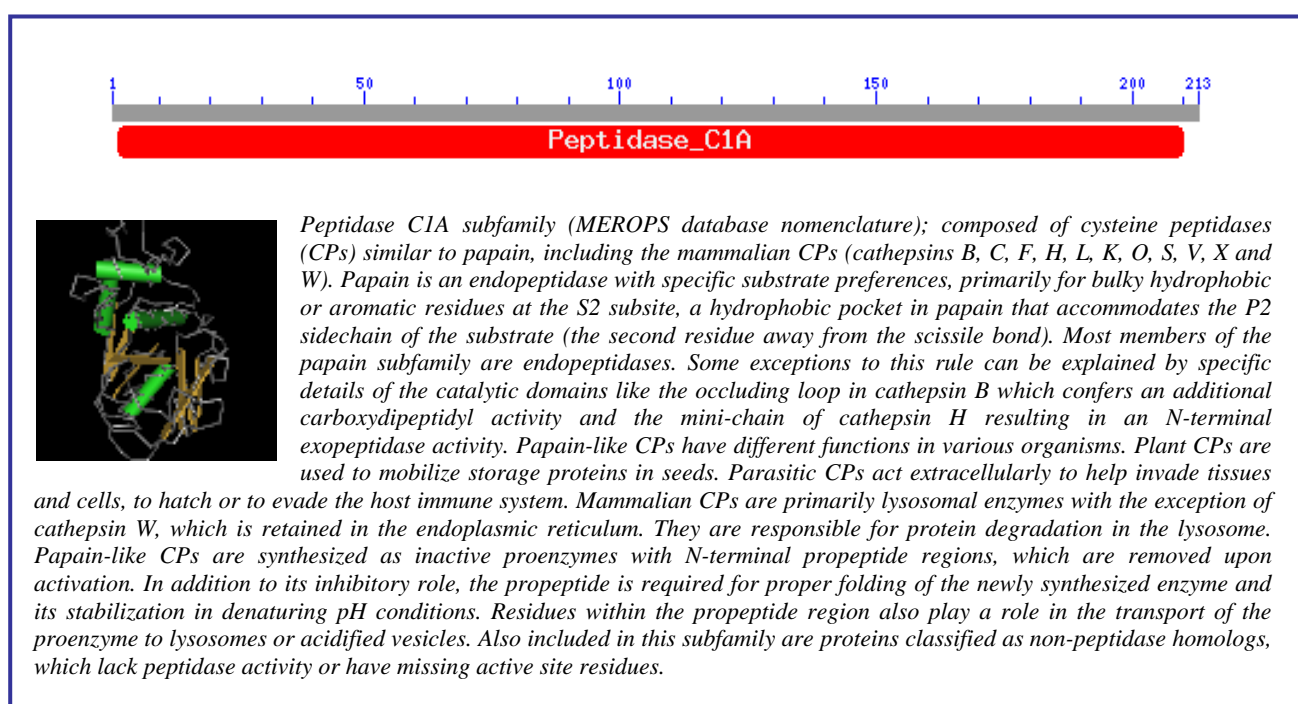


Figura 10. Resultado del alineamiento de araujiaina por BLAST con una secuencia consenso correspondiente a la subfamilia C1A de proteasas cisteínicas. Obsérvese el alto grado de homología obtenido (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Utilizando el mismo servicio se pudo comprobar que la secuencia de araujiaina a II mostró un grado de identidad entre el 47 y 53% con 43 proteasas cisteínicas de la subfamilia C1A, entre ellas las proteasas del látex de *Carica papaya*: caricaína (51%), glicilendopeptidasa (49%), quimopapaína (48%), y papaína (47%). El alineamiento también permite elaborar diagramas cladísticos (cladogramas) en base a los cuales puede obtener información funcional y evolutiva sobre las proteínas a ser comparadas (Fig. 11).

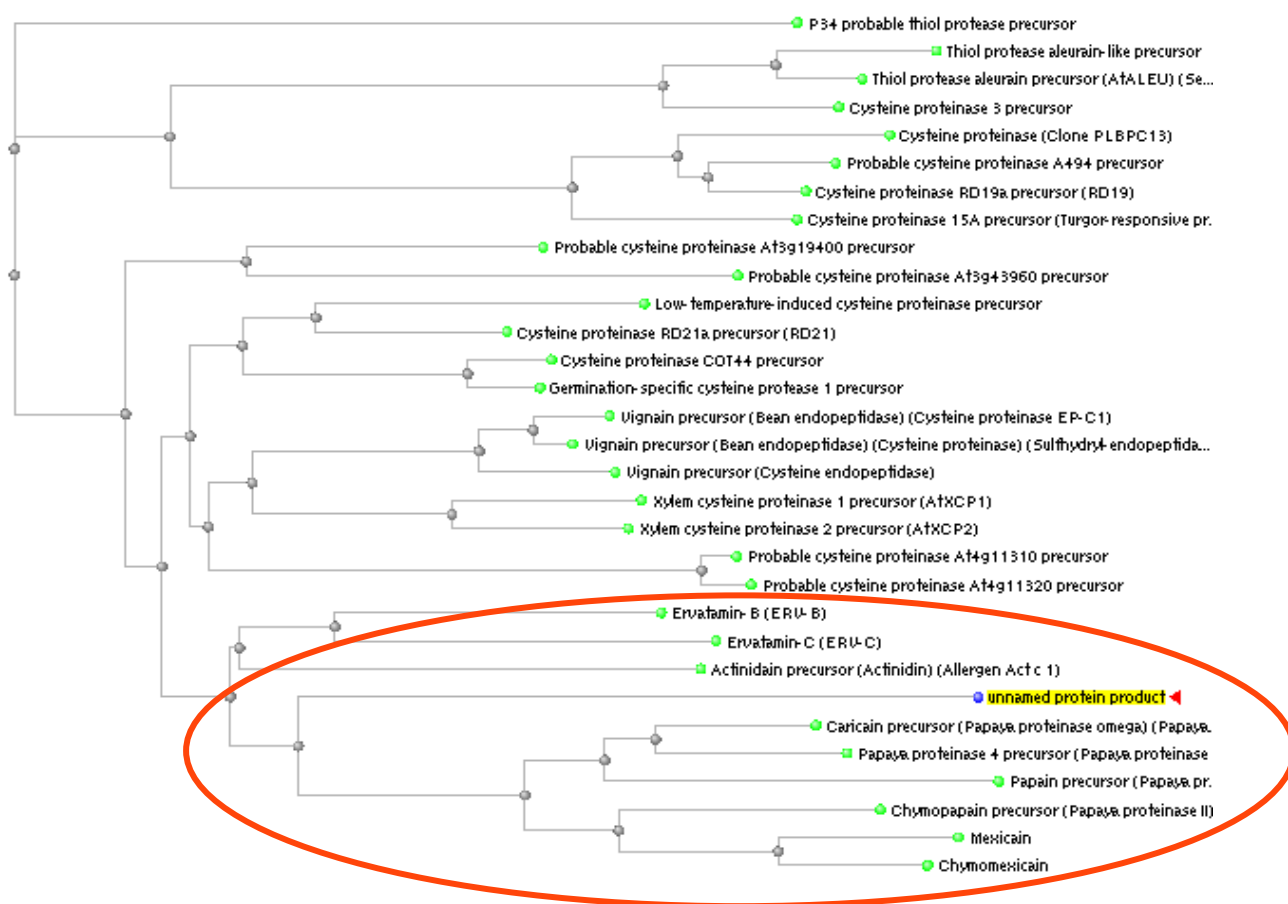


Figura 11. Cladograma del alineamiento de araujiína aII obtenido utilizando el servicio BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). En rojo se destaca la relación de araujiína aII ("unnamed protein product") con las proteasas vegetales con las que exhibe el mayor grado de homología.

Como se observa en la Fig. 11, el análisis comparado de la secuencia de araujiína aII revela un estrecho parentesco funcional con otras proteasas vegetales que integran la subfamilia C1A, así como una cercana ubicación taxonómica con las especies productoras, sugiriendo la existencia de ancestros comunes.

Con el propósito de obtener más información acerca de las relaciones filogenéticas de araujiína aII, así como de detectar la existencia de regiones altamente conservadas entre todas las proteínas homólogas y hacer una predicción de la estructura de la proteína y de la importancia de ciertas regiones en la conformación tridimensional, se recurrió al programa CLUSTAL W, una de las herramientas informáticas más utilizadas para estos fines (Fig. 12).

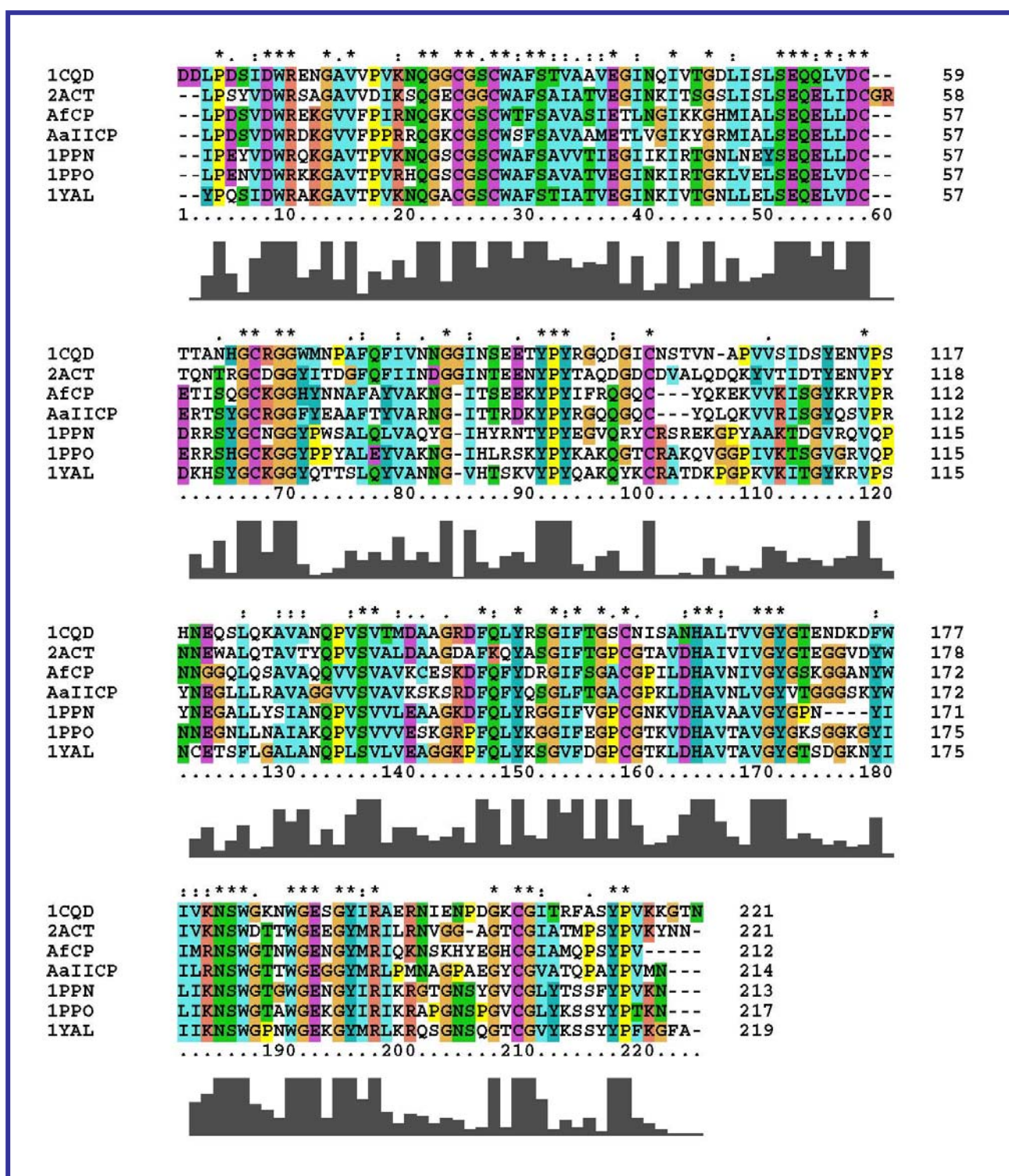


Figura 11. Alineamiento múltiple de araujaína aII con las secuencias completas de papaína (PPN), caricaína (PPO), actinidaína (2ACT), zingipaína (1CQD), quimopapaína (1YAL) y asclepain f (AfCP), endopeptidasas cisteínicas de la subfamilia C1A. Software utilizado: CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

En la Figura 11 se muestra el alineamiento de la estructura primaria de araujaína a II con las secuencias completas de algunas proteasas cisteínicas que han sido resueltas por estructura cristalográfica. Caricaína, (Pickersgill *et al.*, 1991) y actinidaína (Baker *et al.*,

1980) son las que exhiben mayor similitud con araujiaina a II (51% de identidad), seguidas por quimopapaína con 48 % de identidad (Maes *et al.*, 1996), en tanto que zingipaína a (Choi *et al.*, 1999) y papaína (Pickersgill *et al.*, 1992) muestran un 47% de identidad. Adicionalmente se incluyó en la comparación una proteasa cisteínica aislada en nuestro laboratorio a partir del látex de *Asclepias fruticosa* (Trejo, 2005), cuya secuencia muestra un 70 % de identidad con araujiaina aII, confirmando las relaciones filogenéticas existentes entre las especies productoras.

Como era de esperar, hay un elevado grado de conservación de residuos aminoacídicos, algunos de los cuales son esenciales para la catálisis y para el mantenimiento de la estructura tridimensional que caracteriza a estas proteasas, representada por dos dominios principales que flanquean el sitio activo de la enzima. Así, se encuentran conservados los residuos Cys25 e His159 (numeración de papaína) que conforman la díada catalítica presente en todas las cisteín-endopeptidasas. Entre otros residuos a los que se les ha asignado distintos roles funcionales se encuentra la Gln19, a la que se atribuye la función de estabilizar el intermediario tetraédrico previsto en el mecanismo catalítico. También están conservados los residuos Phe141, Trp178 y Trp182, que conforman el bolsillo hidrofóbico en el que está localizado el puente de hidrógeno formado entre la Asn176 y la His159. Al igual que papaína, araujiaina aII contiene siete residuos de Cys, los cuales están altamente conservados: Cys25 corresponde al sitio activo, en tanto que las otras seis Cys conservadas participan de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas (Cys22-Cys56, Cys63-Cys95 y Cys150-Cys201).

Modelado de araujiaina a II

En la Figura 12 se observa en detalle la estructura del modelo tridimensional de araujiaina aII en dos posiciones (A y B). En color rojo se representan las estructuras β , en color celeste las hélices α , los puentes disulfuro se representan en color naranja y los residuos del centro activo están en amarillo verdoso (A) o azul (B). Los parámetros de procesamiento del modelo se ajustaron teniendo en cuenta los apareamientos disulfuro entre las Cys22-Cys56, Cys63-Cys95 y Cys150-Cys201 (la numeración corresponde a araujiaina aII).

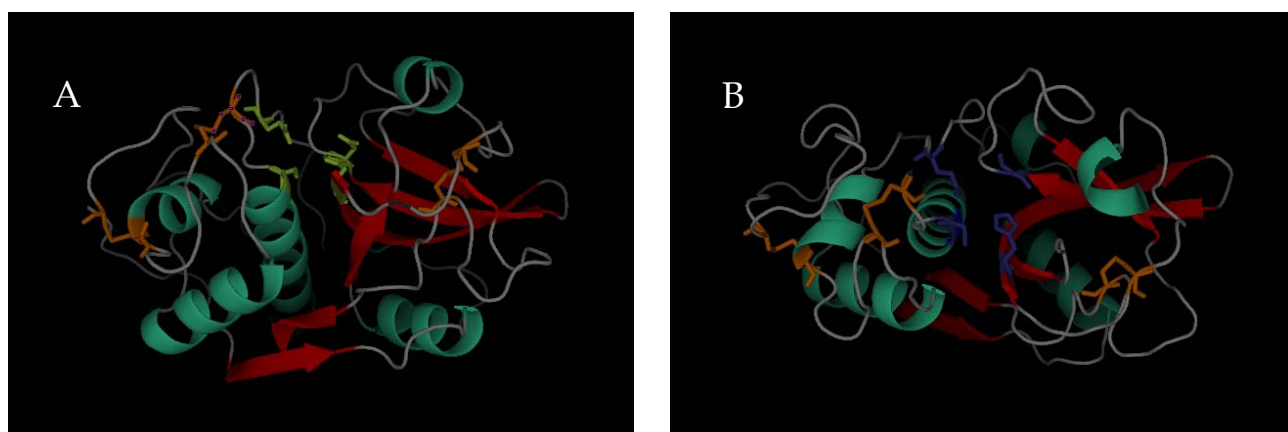


Figura 12. Modelo tridimensional de araujaína aII obtenido mediante el uso del software Pymol utilizando la base de datos Swiss-Prot. A) Vista lateral. B) Vista superior.

A la izquierda (extremo N-terminal) se encuentra el dominio L, constituido por α hélices en cuyo extremo superior pueden observarse los residuos catalíticos Gln19 y Cys25. Este dominio está estabilizado por la presencia de dos puentes disulfuro, Cys22-Cys56 y Cys63-Cys95. En el dominio R que se presenta a la derecha se hallan los residuos catalíticos His159 y Asn176; el mismo está constituido principalmente por una estructura de barril- β y contiene un puente disulfuro entre la Cys150 y la Cys201, que le confiere estabilidad a la estructura.

Al superponer las estructuras tridimensionales de araujaína aII y de papaína puede comprobarse el alto grado de solapamiento de ambas, esencialmente en las zonas correspondientes a las hélices α y a las hojas plegadas β (Fig. 13, A), hecho que aporta una visión estructural a las relaciones evolutivas ya evidenciadas por los estudios de alineamiento de secuencias previamente efectuados. Las posibilidades que brinda el análisis 3-D permiten además la visión del bolsillo donde se aloja el sitio activo de la enzima (Fig. 13, B), así como un detalle de los residuos aminoacídicos que conforman el mismo (Fig. 13, C).

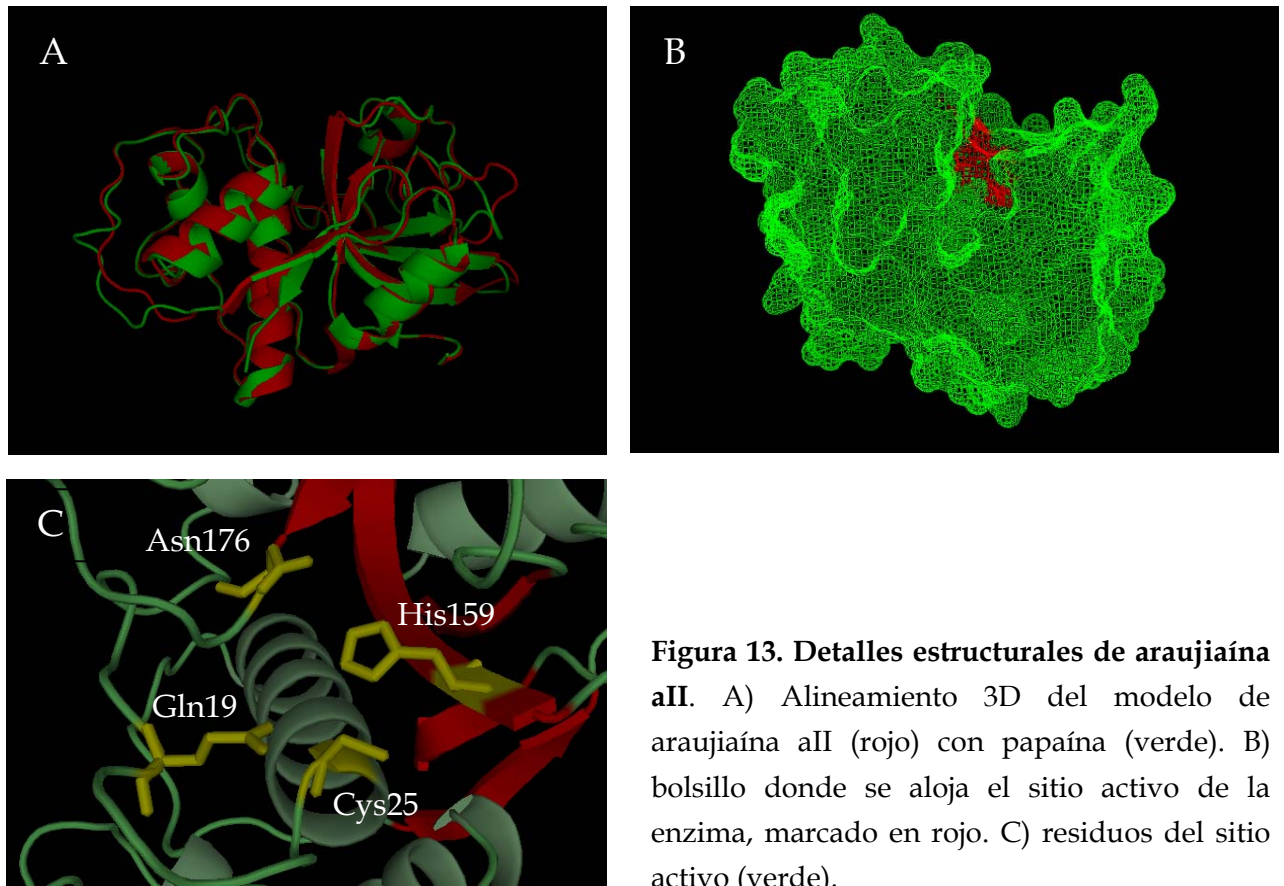
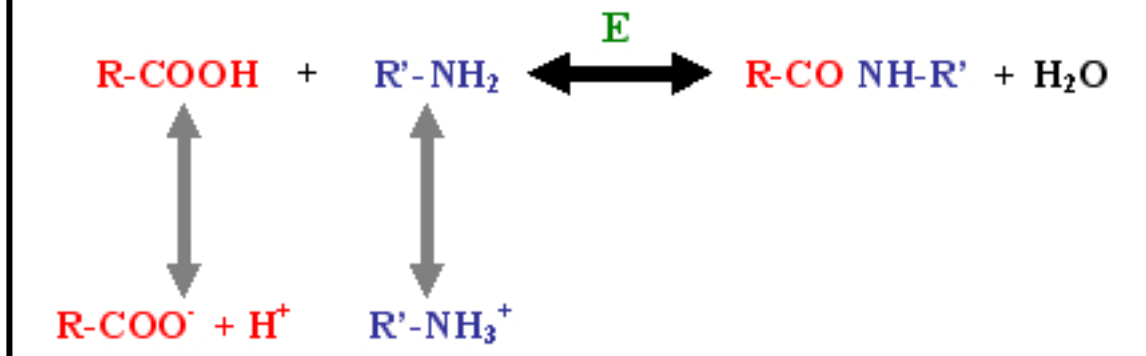


Figura 13. Detalles estructurales de araujaína aII. A) Alineamiento 3D del modelo de araujaína aII (rojo) con papaína (verde). B) bolsillo donde se aloja el sitio activo de la enzima, marcado en rojo. C) residuos del sitio activo (verde).

Control Termodinámico



RESULTADOS & DISCUSIÓN

Inmovilización Enzimática & Síntesis Peptídica

INMOVILIZACIÓN EN DISTINTOS SOPORTES

Entrampamiento en geles de poliacrilamida

Los resultados obtenidos en la inmovilización de enzimas por entrampamiento son mostrados en la Fig. 1. En base a los mismo se puede concluir que las proteasas presentes en el extracto crudo de *Araujia hortorum* pueden ser entrampadas en geles de poliacrilamida de distinto tamaño de poro y mantienen la actividad caseinolítica, siendo mayor la actividad cuando la concentración de poliacrilamida es del 10%.

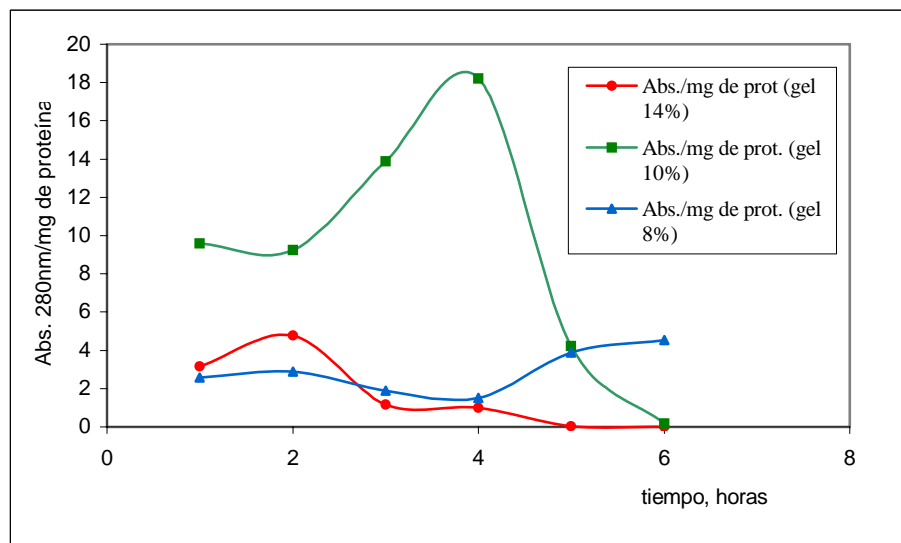


Figura 1. Actividad caseinolítica de *Araujia hortorum* entrampada en geles de poliacrilamida de distinto porcentaje de monómero.

Para realizar los cálculos se tuvo en cuenta la actividad caseinolítica resultante calculando la absorbancia a 280 nm por mg de proteína entrampada.

Inmovilización por adsorción en poliamida

Se determinó la cantidad de proteínas y la actividad caseinolítica del EC de *Araujia hortorum* luego de la liofilización. Para 0,65 mg de proteínas sobre 1 mg de sólido se obtuvo una actividad total de 0,06 UCAS, resultando una actividad específica de 0,1 UCAS/mg de proteína.

A fin de saber en qué medida quedaría afectada la actividad proteolítica por el proceso de inmovilización, se determinó la actividad específica del EC libre y adsorbido en

poliamida empleando PFLNA como sustrato. Luego del proceso de adsorción se recuperó 20-25 % de la actividad original, donde la actividad específica inicial de la enzima libre fue de 0,83 U_{PFLNA}/mg de proteína y la actividad específica luego de la inmovilización fue de 0,20 U_{PFLNA}/mg de proteína. Esta pérdida de actividad enzimática podría deberse a que las condiciones de adsorción sobre el soporte desnaturalizarían irreversiblemente a las proteasas presentes en los extractos.

La actividad de las preparaciones inmovilizadas (unidades internacionales, UI) fue ensayada también frente a distintos sustratos sintéticos cromogénicos tales como Z-Arg-pNA, Z-Phe-Arg-p-NA y BAPNA. Los resultados se muestran en la Tabla 1, en la que se puede apreciar que araujaína mostró muy buena actividad con Z-Arg-pNA y BAPNA, pero la actividad fue prácticamente no detectable con Z-Phe-Arg-p-NA.

Sustrato	Actividad enzimática	<i>A. hortorum</i> (EC)
PFLNA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	0,013
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	0,2
Z-Arg-p-NA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	3,3
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	51
BAPNA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	2,8
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	43
Z-Phe-Arg-p-NA	Actividad (UI/mg preparación inmovilizada)	n. d.
	Actividad específica * (UI/mg proteína inmovilizada)	n. d.

Tabla 1. Unidades internacionales (UI) determinadas para el EC de *Araujia hortorum* frente a diferentes sustratos. n. d.: no determinada. * La actividad específica fue calculada asumiendo que toda la proteína presente en cada extracto pudo adsorberse sin perderse nada, debido a las drásticas condiciones del proceso completo.

Los resultados obtenidos de la determinación de actividad frente a los sustratos estudiados son alentadores en cuanto al uso de de las fitoproteasas adsorbidas en poliamida en diversos procesos biotecnológicos.

Inmovilización por unión covalente a geles de agarosa activada

La actividad específica de la enzima inmovilizada fue de 0,032 U_{PFLNA}, la actividad de la enzima soluble fue de 0,065 U_{PFLNA} y el rendimiento de inmovilización fue del orden del 50%. Los resultados obtenidos fueron semejantes a los de poliamida, decidiéndose utilizar estos geles en las reacciones de síntesis, dada la estabilidad de este tipo de inmovilización.

SÍNTESIS PEPTÍDICA

1) Utilizando enzima libre

Síntesis bajo control cinético

Cuando la síntesis bajo **control cinético** fue llevada a cabo en hexano al 50%, la mayor concentración del dipéptido se obtuvo luego de 24h, correspondiendo a un valor de 0,44 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto del 11% (Fig. 1).

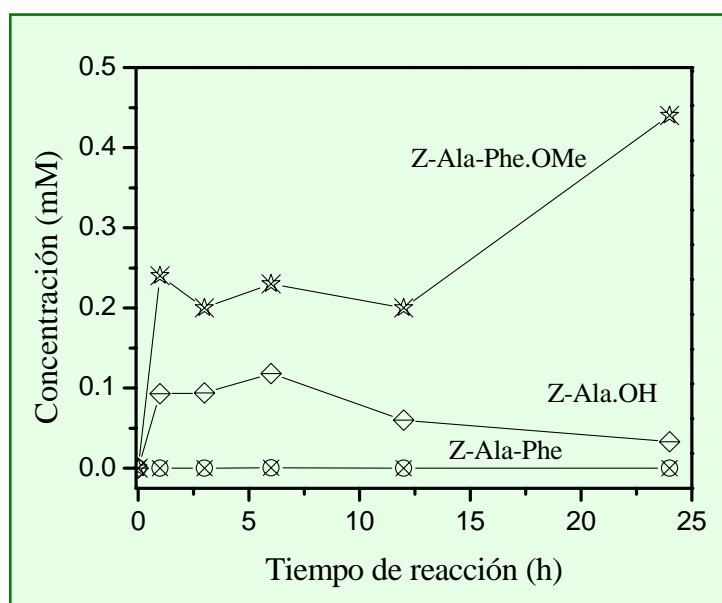
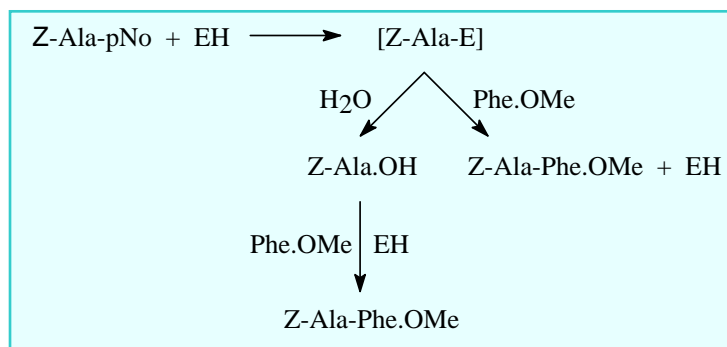


Figura 1. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala-p-nitrofenil éster como donante de acilo en hexano 50%, en función del tiempo.

Cabe aclarar que el porcentaje de conversión (X_p) representa la cantidad de producto obtenido en función del reactivo limitante y se calcula dividiendo la concentración Z-Ala-Phe.OMe (mM) por la concentración inicial del reactivo limitante.

En hexano al 50% (v/v), la concentración de Z-Ala.OH aumentó hasta las 6 h de reacción, pero luego disminuyó originando un aumento significativo en la concentración del dipéptido a las 24 h de reacción. Esto se debería a que en un comienzo el dipéptido es formado rápidamente a través del ataque nucleofílico de la Phe.OMe sobre el intermediario acil-enzima, pero luego el producto de hidrólisis del donante de acilo reaccionaría con el nucleófilo en una reacción bajo control termodinámico con el consiguiente aumento en la concentración del dipéptido.

A continuación se describe el esquema general de la reacción:



donde EH = enzima, Phe.OMe = nucleófilo. [Z-Ala-E] = intermediario acil enzima, Z = grupo protector amino terminal, N- α -CBZ, pNo = grupo protector carboxilo terminal, *p*-nitrofenil éster, Z-Ala-pNo = donante de acilo, N- α -CBZ-Ala-*p*-nitrofenol, Z-Ala.OH = producto de hidrólisis del donante de acilo, N- α -CBZ-Ala.OH y Z-Ala-Phe.OMe = producto de síntesis, N- α -CBZ-Ala-Phe.OMe.

Por su parte, en acetato de etilo (50% v/v), la máxima concentración del producto se alcanzó a las 30 min correspondiendo a un valor de 2,37 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto del 59,25% (Fig. 2).

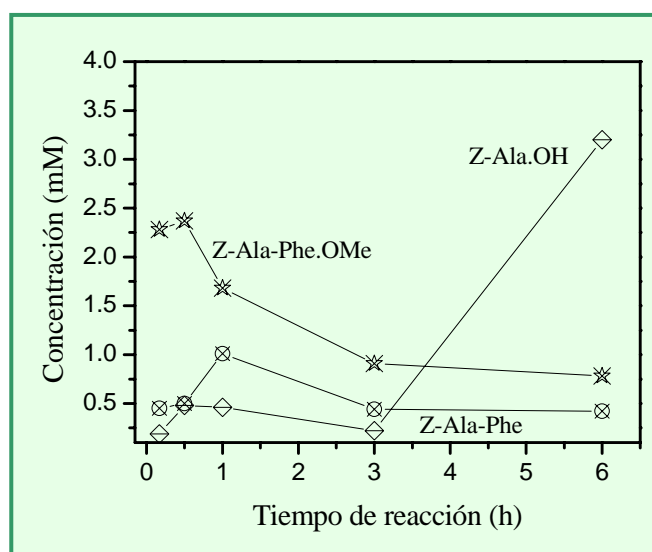


Figura 2. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizada por el EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala-*p*-nitrofenil éster como donante de acilo en acetato de etilo 50%, en función del tiempo.

Como se puede observar, si bien se obtuvo mayor rendimiento en este medio, la hidrólisis del dipéptido fue también elevada (Quiroga *et al.*, 2008).

Síntesis bajo control termodinámico

Cuando el donante de acilo utilizado fue Z-Ala.OH, la síntesis peptídica transcurrió bajo **control termodinámico**.

La variación en el tiempo de la concentración de los diferentes componentes de la síntesis bajo control termodinámico en hexano 50%, se muestra en la Fig. 3.

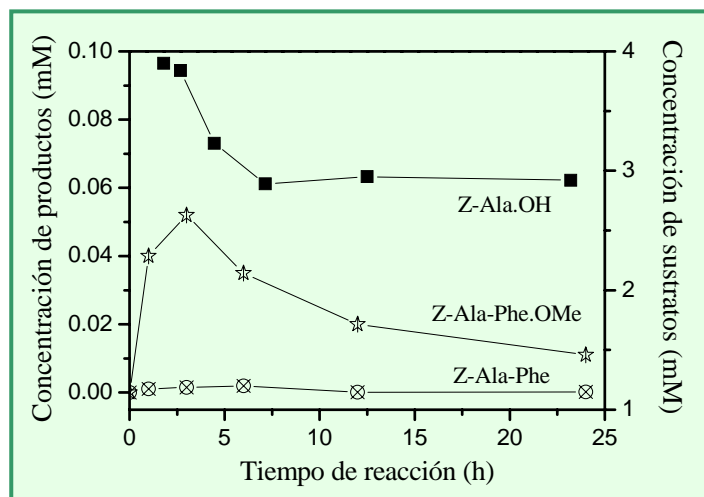


Figura 3. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por el EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala.OH como donantes de acilo y Phe.OMe (4mM) en hexano 50%, en función del tiempo.

Como puede observarse, la mayor concentración del dipéptido se obtuvo luego de 3 h, correspondiendo a un valor de 0,052 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto de 1,3%. Los porcentajes de conversión en producto fueron notablemente menores que aquellos obtenidos en las síntesis bajo control cinético. Además, a partir de la 3 h de reacción el producto peptídico comenzó a ser hidrolizado, con el consiguiente aumento observado en el perfil de concentración de Z-Ala.OH.

Cuando la síntesis bajo control termodinámico fue llevada a cabo en acetato de etilo (50%, v/v) se observaron rendimientos notablemente mayores que aquellos observados en hexano. La mayor concentración del dipéptido se obtuvo luego de 1 h de reacción correspondiendo a un valor de 2,5 mM, lo cual equivale a un porcentaje de conversión en producto de 62,25%. Los porcentajes de conversión en producto fueron mayores que aquellos obtenidos en las síntesis bajo control cinético. Además, a partir de la 3 h de reacción el producto peptídico comenzó a ser hidrolizado, con el consiguiente aumento observado en el perfil de concentración de Z-Ala.OH (Fig. 4).

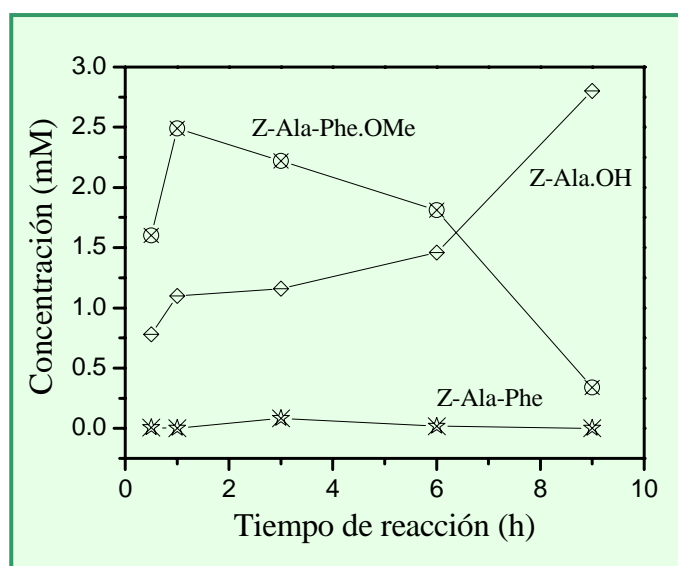


Figura 4. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por el EC de *Araujia hortorum*, utilizando Z-Ala.OH como donantes de acilo y Phe.OMe (4mM) en acetato de etilo 50%, en función del tiempo.

Las concentraciones y los porcentajes de conversión en producto fueron mucho mayores en acetato de etilo (50%) que en hexano (50%). Esto podría deberse a que en hexano el coeficiente de partición del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe es notablemente menor que en acetato de etilo (P_{Hex} : 1,3 y P_{AcEt} : 270). Por ello, la desviación del equilibrio hacia la síntesis se vió desfavorecida en hexano (50%), quedando el dipéptido expuesto a la hidrólisis secundaria no deseada.

Si comparamos entonces los resultados obtenidos en ambos medios bifásicos (Fig. 5),

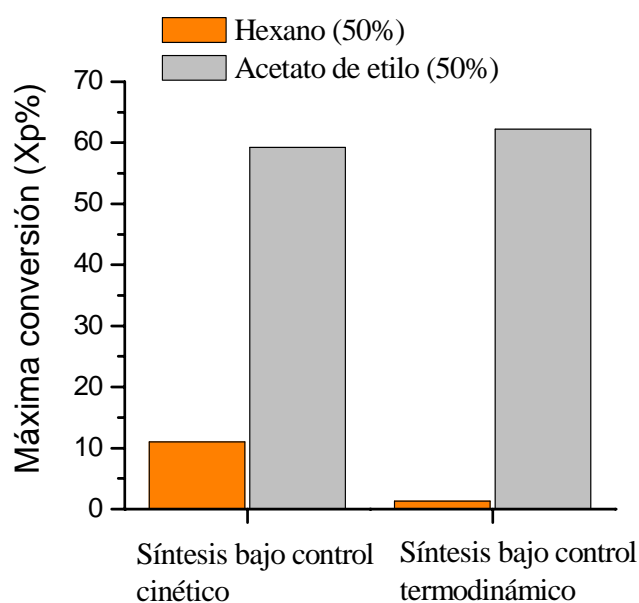


Figura 5. Esquema comparativo de la síntesis bajo control cinético y bajo control termodinámico en medio Hexano (50%) y Acetato de Etilo (50%) utilizando el EC de *Araujia hortorum*.

se observa claramente que el medio de reacción más favorable para la síntesis del dipéptido amargo es aquel formado por acetato de etilo y buffer (50:50).

2) Síntesis en medios orgánicos utilizando el EC de *Araujia hortorum* inmovilizado como catalizador

Una de las mayores desventajas del uso de enzimas libre en la síntesis de péptidos es la imposibilidad de su reutilización. Al ser las enzimas solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por lo tanto, no se pueden reutilizar. Debido a ello, la inmovilización de enzimas han permitido superar estos últimos inconvenientes, haciendo que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Teniendo en cuenta que la *unión covalente multipunto* es quizás el método más interesante desde el punto de vista industrial, es el más efectivo en términos de estabilización operacional y ofrece gran flexibilidad en cuanto al diseño del biocatalizador, y en base a los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento y a la estabilidad del sistema inmovilizado, que permite la reutilización de la enzima en diversos procesos sin pérdida apreciable de actividad, se decidió utilizar el EC de *A. hortorum* inmovilizado en forma covalente sobre gel de glioxil-agarosa como catalizador de la síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe en el medio bifásico acetato de etilo (50%).

Para llevar a cabo la síntesis del precursor del dipéptido amargo se respetaron las mismas condiciones de reacción utilizadas para la síntesis con la enzima libre. El medio de reacción seleccionado fue el medio formado por acetato de etilo y buffer (50:50) debido a que fue el medio en el cual se obtuvieron los mejores rendimientos cuando la reacción estuvo catalizada por la enzima libre.

Síntesis bajo control cinético

En la síntesis bajo control cinético (Fig. 6), la mayor concentración del dipéptido (2,23 mM) equivalente a un porcentaje de conversión en producto del 57,5%, se obtuvo luego de 1h de reacción. Hacia las 9h de reacción, la cantidad del péptido descendió debido a la formación del producto de hidrólisis de dicho péptido con una conversión en producto hidrolizado del 45%.

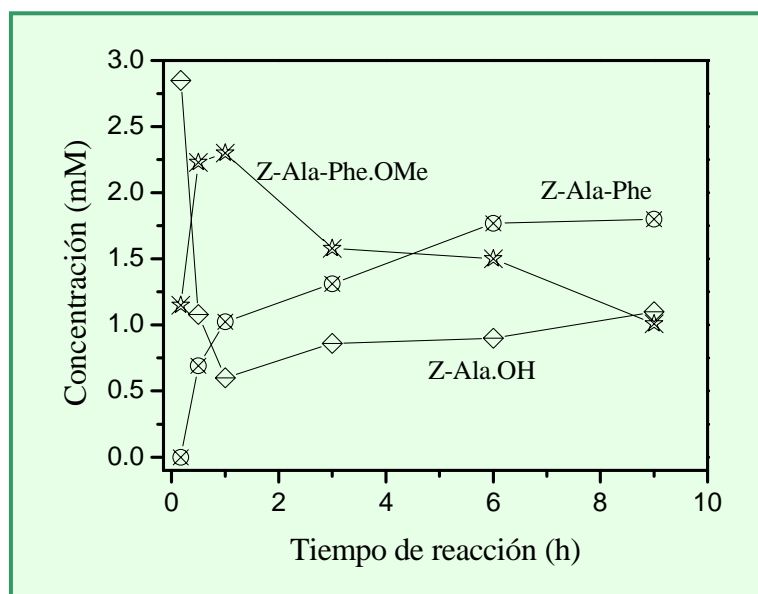


Figura 6. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis del dipéptido Z-Ala-Phe.OMe catalizado por araujaína inmovilizada, utilizando Z-Ala-pNo como donantes de acilo y Phe.OMe (4mM) en acetato de etilo 50%, en función del tiempo.

Síntesis bajo control termodinámico

Cuando la síntesis se llevó a cabo bajo **control termodinámico**, el porcentaje de conversión en producto fue aproximadamente la mitad del valor obtenido anteriormente siendo 25,25% luego de 24h de reacción, sin observar una hidrólisis significativa del mismo.

Del análisis comparativo de los resultados obtenidos en la síntesis de Z-Ala-Phe.OMe en acetato de etilo (50% v/v), se puede concluir que tanto araujaína libre como inmovilizada fueron buenos biocatalizadores bajo las condiciones de reacción establecidas.

El mayor porcentaje de conversión en producto (62,25 %) se observó en la síntesis bajo control termodinámico, usando el EC de *Araujia hortorum* libre como catalizador, en acetato de etilo al 50% (v/v). Esto se debió a la favorable partición del dipéptido en la fase orgánica, la cual desvió el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto de interés.

Cuando la síntesis fue llevada a cabo bajo control cinético se obtuvieron resultados similares, ya sea utilizando enzima libre o inmovilizada. Los porcentajes de conversión fueron 59,25 % y 57,5 %, respectivamente (Fig. 7).

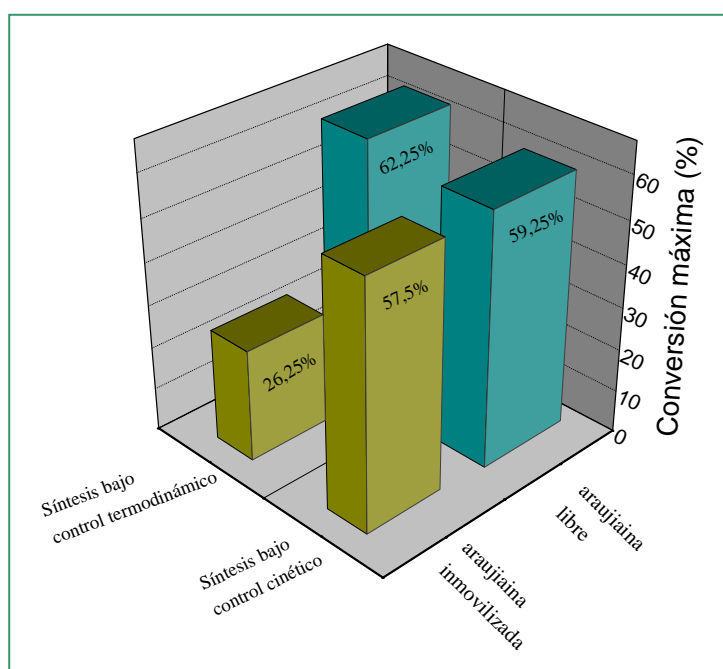


Figura 7. Gráfico comparativo de los máximos porcentajes de conversión obtenidos en la síntesis bajo control cinético y termodinámico de Z-Ala-Phe.OMe, usando el EC de Araujia hortorum libre e inmovilizado en acetato de etilo 50%.

Detección por HPLC-masas

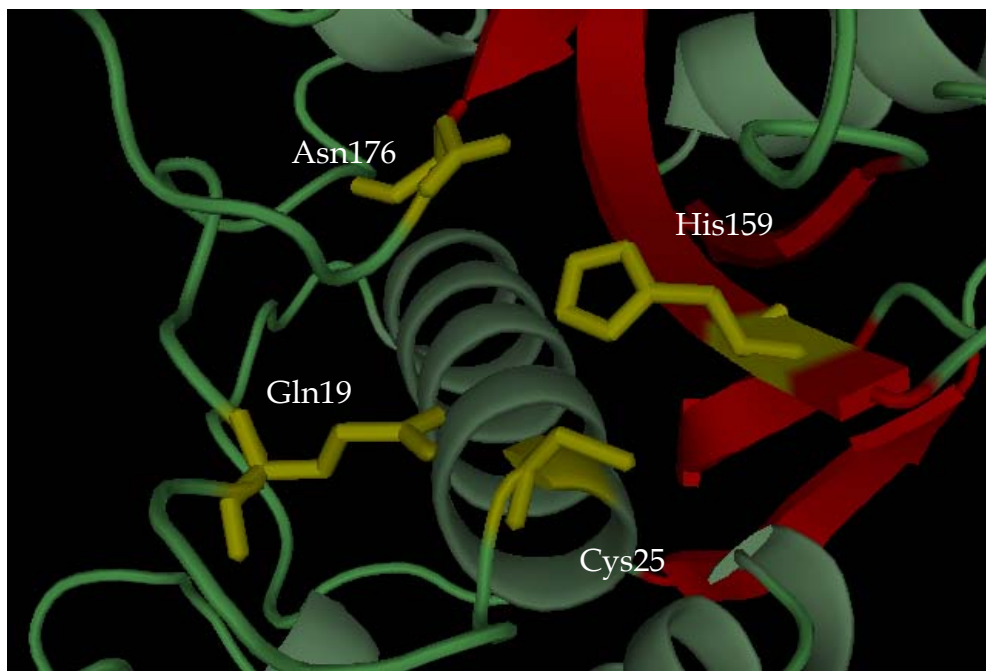
Se procesaron las siguientes muestras a fin de confirmar los productos mediante HPLC masas:

- producto de la síntesis mediante enzima libre durante una hora de reacción por control termodinámico.
- Producto de la síntesis mediante enzima inmovilizada en agarosa durante 30 min por control cinético.
- Producto de la síntesis mediante enzima inmovilizada en agarosa durante 1 hora por control cinético
- Producto de la síntesis mediante enzima inmovilizada en agarosa durante 6 horas por control cinético

Se observó la aparición de un pico del producto esperado (Z-Ala-Phe-OMe) con un t_R de 23 min (muestras b, c y d). La identidad de dicho pico se corroboró por espectroscopía de masas (ES MS), $[M+H^+ : 385,1]$. También se detectó el reactivo Z-Ala-OH con un t_R de 12,7 min (muestra a) y se confirmó su identidad por ES MS $[M+H^+ : 246]$.

- Abraham, K.I. & P.N. Joshi (1979b) Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. II. Physico-chemical properties of calotropain-FI and F-II, *Biochim. Biophys. Acta* **568**: 120-6.
- Arribére, M.C., A.A. Cortadi, M.S. Gattuso, M.P. Bettiol, N.S. Priolo & N.O. Caffini (1998) "Isolation and biochemical characterization of latex comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. Cysteine peptidases", *Phytochem Anal* **9**: 267-73.
- Arribére, M.C., S.E. Vairo Cavalli, N.S. Priolo, N.O. Caffini, M. Gattuso and A.A. Cortadi (1999) Proteolytic enzymes from the latex of *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*), *Acta Horticulturae* **501**: 259-68.
- Baker, E.N. & E.J. Dodson (1980) "Crystallographic Refinement of the Structure of Actinidin at 1.7 Angstroms Resolution by Fast Fourier Least-Squares". *Methods Acta Crystallogr., Sect.A*, **36**: 559.
- Barragán B.E., M.T. Cruz, L.M. del Castillo & M. Castañeda-Agulló (1985) "Proteinases of mexican plants. XI. Asclepain g from the látex of *Asclepias glaucescens*" *Rev. Latinoamer. Quím.*, **16**:117-119.
- Barrett, A.J., A.A. Kembhavi, M.A. Brown, H. Kirschke, C.G. Knight, M. Tamai & K. Hanada (1982) "L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L". *Biochem. J.*, **201**:189-198.
- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner, eds (2004) "Handbook of Proteolytic Enzymes" (2nd. Ed.), Elsevier Academic Press, London, UK.
- Beynon R. & J.S. Bond (2001). "Proteolytic enzymes. Practical approach." 2nd Edition. Oxford University Press. New York. pp. 340.
- Brockbank, W.J. & K.R. Lynn (1979) "Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed)". *Biochim. Biophys. Acta.*, **578**:113-122.
- Carter CE, H. Marriage & P.W. Goodenough (2000) "Mutagenesis and kinetic studies of a plantcysteine proteinase with an unusual arrangement of acidic amino acids in and around the active site". *Biochemistry*, **39**: 11005.
- Choi, K. H., R. A. Laursen & K. N. Allen, (1999) "The 2.1 Angstrom Structure of a Cysteine Protease with Proline Specificity from Ginger Rhizome, *Zingiber officinale*". *Biochemistry*, **38**: 11624.
- Filippova I.Y., E.N. Lysogorskaya, E.S. Oksenoit, G.N. Rudenskaya & V.M. Stepanov (1984) "L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide -A chromogenic substrate for thiol proteinase assay". *Anal. Biochem.*, **143**: 293-297.
- Liggieri, C.S., M.C. Arribére, S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Aviles & N.S. Priolo (2004) "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L.". *Protein J.*, **23**: 403-11.
- Lynn, K.R., W.J. Brockbank & N.A. Clevette-Radford (1980) "Multiple forms of the asclepains, cisteinyl proteases from milkweed". *Biochim. Biophys. Acta*, **612**: 119-25.
- Maes, D., J. Bouckaert, F. Poortmans, L. Wyns & Y. (1996) "Looze Structure of chymopapain at 1.7 Å resolution". *Biochemistry*, **35**: 16292.
- Morcelle del Valle, S.R. (2004a) "Estudio de las proteasas del látex de *Funastrum clausum* (*Asclepiadaceae*) para su uso en la síntesis de péptidos". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional
- Morcelle, S.R., S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Aviles & N.S. Priolo (2004b) "Funastrain c II: a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*". *Protein J.*, **23**: 205-15

- Obregón, W.D., M.C. Arribére, S.M. Morcelle del Valle, C. Liggieri, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2001) "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.*, **20**: 317-25.
- Obregón, W.D., R. Curciarello, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2006) "Hidrolitic Profile and isolation of the Proteolytic Components of Latex from *Araujia angustifolia* Fruits" *Acta Farm. Bonaerense*, **25**: 206-12.
- Pal, G. & N.K. Sinha, (1980). "Isolation, crystallization and properties of Calotropis DI and DII of *Calotropis gigantea*. *Arch Biochem. Biophys.*, **202**:321-329.
- Pickersgill, R. W., P. Rizkallah, G.W. Harris & P.W. Goodenough (1991) "Determination of the structure of papaya protease omega". *Acta Crystallogr B*, **47**: 766.
- Pickersgill, R.W., G.W. Harris & E. Garman (1992) "Structure of Monoclinic Papain at 1.60 Angstroms Resolution". *Acta Crystallogr., Sect. B*, **48**: 59.
- Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L.M.I. López & N.O. Caffini (2000) "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits". *J. Protein Chem.*, **19**: 39-48.
- Quiroga E., N. Priolo, D. Obregón, J. Marchese & S. Barberis (2008) "Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (*Asclepeadaceae*) fruits". *Biochemical Engineering Journal*, **39**: 115-120.
- Rowan A.D. & D.J. Buttle (1994) "Pineapple cysteine endopeptidases". En: *Methods in Enzymology*, Vol. 244. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 555- 568.
- Sengupta, A., D. Bhattacharya, G. Pal & N.K.Sinha (1984) "Comparative studies on calotropins DI and DII from the latex of *Calotropis gigantea*". *Arch. Biochem. Biophys.*, **232**: 17-25.
- Sequeiros, C., M.J. Torres, S.A. Trejo, J.L. Esteves, C.L. Natalucci & L.M.I. López (2005) "Philibertain g I, The most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*)". *The Protein Journal*, **24**:445-53.
- Sluyterman LA, & J.Wijdenes (1972) "Sigmoidal progress curves in the polymerization of leucine methyl ester catalyzed by papain". *Biochim. Biophys. Acta*, **289**:194-202.
- Storey R.D. & F.W. Wagner (1986) "Plant proteases: a need for uniformity". *Phytochemistry*, **25**: 2701-2709.
- Tablero, M., R. Arreguín, B. Arreguín, M. Soriano, R. I. Sánchez, A. Rodríguez Romero & A. Hernández-Arana (1991) "Purification and characterization of multiple forms of asclepain g from *Asclepias glaucescens* H.B.K.". *Plant Sci.*, **74**: 7-15.
- Trejo, S.A., L.M.I. López, C.V. Cimino, N.O. Caffini & C.L. Natalucci (2001) "Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from the latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)". *Journal of Protein Chemistry*, **20**: 445-53.
- Trejo, S.A. (2005) "Purificación, caracterización bioquímica y estructural y expresión de una endopeptidasa cisteínica de látex de *Asclepios fruticosa* L. (*Apocynaceae*)", Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Vairo Cavalli, S.E., A. Cortadi, M.C. Arribére, P. Conforti, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2001) "Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)", *Biol. Chem.* **382**: 879-83.
- Vairo Cavalli, S.E., M.C. Arribére, A. Cortadi, N.O. Caffini & N.S. Priolo (2003) "Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)". *J. Protein Chem.* **22**, 15-22.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La presencia de enzimas hidrolíticas, incluidas las proteasas, es una característica frecuente en el látex de muchas especies vegetales que producen este tipo de secreción, donde aparentemente aquéllas estarían relacionadas con mecanismos de defensa aún no totalmente dilucidados.

En el presente trabajo de tesis se han analizado las propiedades hidrolíticas del látex de dos especies de *Asclepiadaceae* que crecen en la zona: *Araujia angustifolia* (Hook et Arn.) Decaisne y *A. hortorum* Fourn. Para ello el látex fue sometido a procesos de centrifugación y ultracentrifugación que permitieron eliminar gomas y otros componentes insolubles, rindiendo los correspondientes extractos crudos (EC). En los EC de ambas especies se detectaron las siguientes actividades hidrolíticas: proteásica, amidásica, esterolítica, poligalacturonidásica y pectinmetilesterásica. No se detectó actividad rhamnogalacturonidásica, xilanásica ni metilcelulásica. Estos resultados confirman que las enzimas presentes en el látex manifiestan actividad hidrolítica frente a sustratos de distinta naturaleza química (amidas y ésteres), reforzando la opinión que prevalece sobre el rol protector del látex como mecanismo de defensa en plantas.

Dado que ambos EC demostraron poseer una importante actividad proteolítica, se decidió caracterizar los mismos, teniendo en cuenta que para las aplicaciones industriales la pureza de las enzimas usualmente es de importancia secundaria.

El contenido de proteínas del EC obtenido a partir del látex de los frutos de *Araujia hortorum* fue considerablemente mayor (5,4 mg/ml) que el correspondiente a *A. angustifolia* (1,5 mg/ml). El agregado de cisteína aumenta la actividad proteolítica de los extractos, lográndose la máxima actividad en presencia de cisteína 12 mM, constituyendo un indicio de que las proteasas contenidas en los mismos deben ser del tipo cisteínico, ya que resultados similares fueron obtenidos en presencia de otros reductores como DTT y β mercaptoetanol. Por otra parte, la actividad proteolítica disminuyó en un 95%

para ambas muestras cuando se agregaron iodoacetato o E-64 (inhibidores irreversibles típicos de proteasas cisteínicas). La inactivación con HgCl_2 (inhibidor reversible) confirmó la naturaleza cisteínica de las proteasas presentes en los extractos crudos, ya que la inhibición pudo ser revertida por el agregado de cisteína.

Cuando se examinó la actividad peptidásica de ambas preparaciones crudas en función del pH, el EC *Araujia angustifolia* mostró máxima actividad (superior al 95%) entre pH 6,7 y 8,5, en tanto que la de *Araujia hortorum* lo hizo a valores de pH ligeramente mayores (7,5-8,5). Este comportamiento es característico de las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1, que exhiben perfiles de actividad en función del pH relativamente amplios y un valor de pH óptimo cercano al pH neutro frente a sustratos sintéticos y proteicos.

Los dos extractivos mostraron una buena estabilidad térmica, manteniendo un 80% de la actividad inicial luego de 30 min de incubación a 45° C en ambos casos, pero el EC de *A. angustifolia* resulta más estable aún, manteniendo hasta un 50% de la actividad inicial luego de 30 min a 60°C. Cuando se utiliza caseína como sustrato, la actividad enzimática llega a un máximo en ambos extractos a los 60 °C. La elevada actividad a temperaturas relativamente altas es otra característica común a las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1, lo que favorece el empleo de estos extractivos en procesos que necesitan realizarse a elevadas temperaturas.

La actividad de los EC también se ensayó sobre sustratos sintéticos: PFLNA y N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los aminoácidos más comúnmente empleados para este tipo de peptidasas (Gln, Ala y Asp). Ambos extractos son activos frente a dichos sustratos, siendo el EC de *Araujia hortorum* ligeramente superior al de *A. angustifolia*.

Cuando los extractos fueron analizados por isoelectroenfoque-zimograma exhibieron varios componentes dentro del rango de pI alcalino, la mayoría de ellos proteolíticamente activos. Esta naturaleza básica también se observó en las

proteasas aisladas del látex de otras *Asclepiadaceae*. En base de estos resultados, en ambos casos se seleccionó la cromatografía de intercambio catiónico como estrategia de purificación para las proteasas presentes en los EC.

La purificación cromatográfica (FPLC) del EC de *A. angustifolia* permitió el aislamiento de tres fracciones activas, llamadas araujaína aI, aII y aIII, respectivamente, de acuerdo a la nomenclatura recomendada para nuevas proteasas vegetales.

El peso molecular de araujaína aI, aII y aIII se estimó en 23 kD (SDS-PAGE) valor del mismo orden que los obtenidos para otras proteasas de *Asclepiadaceae*. Las masas moleculares de las enzimas purificadas se determinaron utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF), que arrojó valores de 23465 D para araujaína aI; 23528 D para araujaína aII y 23489 D para araujaína aIII, confirmando los datos electroforéticos previos.

El rango de pH óptimo para araujaína aI y aII fue bastante estricto (9,0-9,5 y 8,0- 8,5, respectivamente), mientras que para araujaína aIII fue más amplio (7,0-9,5 (Fig. 4). Teniendo en cuenta el perfil de pH del extracto crudo (pH óptimo 6,7-8,5), puede inferirse que las araujaínas aII y aIII son las enzimas que prevalecen y que más aportan en la actividad proteolítica de la preparación enzimática cruda. La acción de diversos inhibidores de proteasas cisteínicas (iodoacetato de sodio, idoacetamida y E-64) produjo una inhibición total e irreversible de la actividad enzimática en todos los casos.

Frente a sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil ésteres araujaína aI y aIII demostraron tener mayor afinidad por el derivado de Ala, pero el comportamiento de araujaína II fue significativamente diferente, ya que hidroliza al derivado de Gln con mayor preferencia que el de Ala. La notoria preferencia de araujaína aI por el derivado de Ala en relación al resto de los derivados de aminoácidos ensayados justificaría la baja actividad caseinolítica de esta enzima, hecho reafirmado por su casi nula actividad sobre PFLNA. El comportamiento de

araujaína aI podría constituir una ventaja para procesos biotecnológicos que requieran alta especificidad de clivaje.

La comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI, aII y aIII con la de otras fitoproteasas demostró que las tres enzimas muestran alta semejanza con proteasas cisteínicas de plantas en general y especialmente con las que pertenecen a especies del género *Asclepias*. Cabe destacar que papaína, considerada como la enzima arquetipo de las peptidasas cisteínicas, muestra un alto grado de identidad con araujaína aI, aII y aIII : 81%, 69% y 79%, respectivamente. La secuencia N-terminal de araujaína aI tiene un 69% de identidad con araujaína aII y un 79% de identidad con araujaína aIII, mientras que entre aII y aIII la identidad hallada es del orden del 74%. Cuando se comparan las secuencias N-terminales de las tres enzimas en estudio se observa que presentan un 50 % de secuencias de aminoácidos coincidentes, muchos de los cuales están conservados en la mayoría de las proteasas cisteínicas del tipo papaína y otros en la misma familia o género.

El análisis del mapa peptídico (peptide mass fingerprint) de araujaína aI, aII y aIII permitió observar que poseen algunos picos equivalentes, lo que demuestra que a pesar de ser diferentes comparten un alto grado de homología entre ellas. Este resultado, junto con los obtenidos mediante la metodología convencional sugieren con mayor certeza que se trataría de isoenzimas.

El EC de *Araujia hortorum* también fue purificado por cromatografía de intercambio catiónico, lo que permitió separar otras tres fracciones activas, a las que se denominó araujaína hI, hII y hIII. Analizadas por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) las tres fracciones resultaron homogéneas y con masas moleculares del orden de los 23 kD. La masa molecular determinada por espectrometría de masas fue de 24031 D, 23718 D y 23545 D para araujaína hI, hII y hIII, respectivamente, características similares a las observadas para las proteasas presentes en el látex de *A. angustifolia*.

La mayor actividad se encuentra en el rango de pH alcalino: araujaína hI y hII muestran un mayor rango de pH óptimo (7,8-9,6 y 7,8-9,4, respectivamente), en

tanto que el de araujaína hIII es más estrecho (8,4 - 9,1). Cabe consignar que la actividad caseinolítica de araujaína hI es casi veinte veces mayor que la de las otras dos proteasas. Los inhibidores específicos de cisteín-proteinasas (iodoacetato y E-64) produjeron una inhibición enzimática total e irreversible en todos los casos. Usando los carbobenzoxi-*p*-nitrofenil ésteres de diversos aminoácidos como sustratos pudo determinarse que el derivado de Gln fue el mejor sustrato para las tres endopeptidasas estudiadas

A diferencia de lo que se encontró en el caso de las proteasas de *A. angustifolia*, las secuencias N-terminales de araujaína hII y de araujaína hIII demostraron tener entre ellas solamente un 53% de identidad, aunque tienen un alto porcentaje de identidad con proteasas aisladas de especies del género *Asclepias* y una considerable homología con las proteasas cisteínicas del género *Caricaceae*. La comparación con papaína revela también un alto grado de identidad (55% y 64% con araujaína hII y hIII, respectivamente). Al encontrarse bloqueado el N-terminal de araujaína hI se decidió analizar una secuencia interna obtenida por tratamiento con la proteasa V8, obteniéndose una notable semejanza con distintas fitoproteasas (casi no existen secuencias completas de proteasas de *Asclepiadaceae*) y también se observaron varios motivos muy conservados, sugiriendo que araujaína hI probablemente comparte un gen ancestral con proteasas cisteínicas obtenidas de especies taxonómicamente menos relacionadas.

Los PMF analizados de araujaína hI, hII y hIII confirmaron que se trata de enzimas distintas, a pesar de que poseen características biofísicoquímicas muy similares. Debido a su ubicación celular y a sus funciones se trataría de isoenzimas. En los espectros se observó que ninguna de las muestras posee picos iguales, lo que fortalece la idea de que no son las mismas enzimas. Por otro lado no se encontraron picos de igual peso molecular provenientes de secuencias conservadas.

Con el objeto de conocer la secuencia completa de alguna de las proteasas caracterizadas se intentó el clonado de las mismas empleando como material de partida el RNA total del látex de *Araujia angustifolia* y de *A. hortorum*. Dado que los primers utilizados no fueron lo suficientemente específicos para la obtención de los cDNA de proteasas de *A. hortorum* el trabajo debió continuarse solamente con las muestras de *A. angustifolia*, logrando clonarse finalmente araujaína aII.

Se determinó la secuencia de araujaína aII a partir del aminoácido 26 y hasta el aminoácido 213, donde aparece la señal de stop de la secuencia nucleotídica. Sólo se pudo establecer la secuencia a partir del aminoácido 26 porque los cebadores utilizados fueron diseñados en base a una secuencia perteneciente a una región altamente conservada (aminoácidos 19 al 25) del sitio activo de la enzima.

Al aplicar la metodología de Peptide Mass Fingerprint (PMF) tanto a la enzima pura como a la secuencia polipeptídica obtenida por clonado y secuenciamiento, la comparación de los péptidos generados en cada caso permitió identificar a la enzima secuenciada como araujaína aII. El N-terminal secuenciado por el método de Edman fue adicionado a la secuencia parcial y de esta manera se obtuvo la secuencia completa de la enzima, que consta de 213 aminoácidos.

La secuencia proteica obtenida de araujaína aII fue introducida en el programa GPMW para calcular algunas de las propiedades fisicoquímicas del polipéptido: masa molecular relativa (23390,66 Da), masa monoisotópica (23375,48Da), coeficiente de extinción molar a 280 nm ($48010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y absortividad molar 2,053, pI con los -SH reducidos (9,36) y con -SH oxidados (10,05). El pI calculado es básico y cercano al valor experimental para araujaína aII (pI 8,5). Por su parte, el valor de masa iónica de la secuencia presenta una diferencia de 114 D en comparación al obtenido por MALDI-TOF MS (23489), lo que podría deberse a fosforilaciones, ya que en la secuencia de araujaína aII se observan motivos diana característicos para este tipo de modificaciones.

El uso del servicio BLAST permitió comprobar que la secuencia de araujiína aII presenta un grado de identidad entre el 47 y 53% con 43 proteasas cisteínicas de la subfamilia C1A, entre ellas las proteasas del látex de *Carica papaya*: caricaína (51%), glicilendopeptidasa (49%), quimopapaína (48%), y papaína (47%). El alineamiento también permitió elaborar diagramas cladísticos (cladogramas) en base a los cuales se pudo comprobar que la secuencia de araujiína aII revela un estrecho parentesco funcional con otras proteasas vegetales que integran la subfamilia C1A, así como una cercana ubicación taxonómica con las especies productoras, sugiriendo la existencia de ancestros comunes.

Con el propósito de obtener más información acerca de las relaciones filogenéticas de araujiína aII, así como de detectar la existencia de regiones altamente conservadas entre todas las proteínas homólogas y hacer una predicción de la estructura de la proteína y de la importancia de ciertas regiones en la conformación tridimensional, se recurrió al programa CLUSTAL W. Se comprobó que hay un elevado grado de conservación de residuos aminoacídicos, algunos de los cuales son esenciales para la catálisis y para el mantenimiento de la estructura tridimensional que caracteriza a estas proteasas. Así, se encuentran conservados los residuos Cys25 e His159 (numeración de papaína) que conforman la díada catalítica presente en todas las cisteín-endopeptidasas. Entre otros residuos a los que se les ha asignado distintos roles funcionales se encuentra la Gln19, a la que se atribuye la función de estabilizar el intermediario tetraédrico previsto en el mecanismo catalítico. También están conservados los residuos Phe141, Trp178 y Trp182, que conforman el bolsillo hidrofóbico en el que está localizado el puente de hidrógeno formado entre la Asn176 y la His159. Al igual que papaína, araujiína aII contiene siete residuos de Cys, los cuales están altamente conservados: Cys25 corresponde al sitio activo, en tanto que las otras seis Cys conservadas participan de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas (Cys22-Cys56, Cys63-Cys95 y Cys150-Cys201).

Con la información existente se elaboró la estructura del modelo tridimensional de araujaína aII. A la izquierda (extremo N-terminal) se encuentra el dominio L, constituido por α hélices en cuyo extremo superior pueden observarse los residuos catalíticos Gln19 y Cys25. Este dominio está estabilizado por la presencia de dos puentes disulfuro, Cys22-Cys56 y Cys63-Cys95. En el dominio R que se presenta a la derecha se hallan los residuos catalíticos His159 y Asn176; el mismo está constituido principalmente por una estructura de barril- β y contiene un puente disulfuro entre la Cys150 y la Cys201, que le confiere estabilidad a la estructura. Al superponer las estructuras tridimensionales de araujaína aII y de papaína puede comprobarse el alto grado de solapamiento de ambas, esencialmente en las zonas correspondientes a las hélices α y a las hojas plegadas β (Fig. 13, A), hecho que aporta una visión estructural a las relaciones evolutivas ya evidenciadas por los estudios de alineamiento de secuencias previamente efectuados.

El extracto crudo de *Araujia hortorum* fue inmovilizado sobre tres tipos de soportes: poliacrilamida, poliamida y agarosa activada. La enzima inmovilizada resultó activa en los tres casos, decidiéndose utilizar los geles de agarosa activada en las reacciones de síntesis, dada la mayor estabilidad que brinda este tipo de inmovilización, lo que asegura su reutilización.

Del análisis comparativo de los resultados obtenidos en la síntesis de Z-Ala-Phe.OMe en acetato de etilo (50% v/v), se puede concluir que tanto la enzima libre como inmovilizada fueron buenos biocatalizadores bajo las condiciones de reacción establecidas. El mayor porcentaje de conversión en producto (62,25 %) se observó en la síntesis bajo control termodinámico, usando enzima libre como catalizador, en acetato de etilo al 50% (v/v), debido a la favorable partición del dipéptido en la fase orgánica, que desvía el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto de interés. Cuando la síntesis fue llevada a cabo bajo control cinético se obtuvieron resultados similares, ya sea utilizando enzima libre o inmovilizada. Los porcentajes de conversión fueron 59,25 % y 57,5 %, respectivamente.